BAND 34, HEFT 2 DEZEMBER 1958

PHYTOPATHOLOGISCHE ZEITSCHRIFT

Begründet von Prof. Dr. E. Schaffnit

Unter Mitwirkung von

Prof. Dr. E. Baldacci, Mailand / Prof. Dr. H. Braun, Bonn / Prof. Dr. W. B. Brierley, Keswick-Cumberland / Prof. Dr. T. Hemmi, Kyoto / Prof. Dr. N. Hiratsuka, Tokyo
Oberreg.-Rat i. R. Dr. E. Köhler, Braunschweig / Prof. Dr. K. O. Müller, Heidelberg
Prof. Dr. H. M. Quanjer, Wageningen / Prof. Dr. T. S. Sadasivan, Madras
Prof. Dr. Tr. Savulescu, Bukarest / Prof. Dr. K. Silberschmidt, São Paulo
Prof. Dr. E. C. Stakman, St. Paul

herausgegeben von den Professoren

E. Gäumann Zürich
M. Klinkowski Aschersleben
H. Richter Berlin-Dahlem

Mit 43 Abbildungen

1958
PAUL PAREY IN BERLIN UND HAMBURG

Phytopath. Z. Bd. 34 Heft 2 *S. 109—228 Berlin 1958*

Postverlagsort Berlin

NSP RAM MH
COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE
12 JAN 1959

INHALT

Abhandlungen

HERZMANN, H., Biochemische Untersuchungen über den Stoffwechsel gesunder und brennfleckenkranker Bohnen. II. Untersuchungen über sekundäre Pflanzenstoffe. Mit 13 Abb. 109

ROTH, G., Einfluß der Quecksilber-Beizung auf Keimung und Jugendwachstum der Gerste unter besonderer Berücksichtigung ihrer selektiven Wirkung auf die samenbegleitende Mikroflora. Mit 7 Abb. 137

HANSEN, F., Anatomische Untersuchungen über Eindringen und Ausbreitung von *Tilletia*-Arten in Getreidepflanzen in Abhängigkeit vom Entwicklungszustand der Wirtspflanze. Mit 19 Abb. 169

BERGMANN, L., Über den Einfluß von Thiouracil und Cytovirin auf das Wachstum und die Virusproduktion isolierter Tomatenwurzeln. Mit 3 Abb. 209

WITTMANN, H. G., Untersuchungen über die Wirkung des Cytovirins auf Virusvermehrung und Wirtswachstum. Mit einer Abb. 221

Besprechungen 228

Manuskripte: In deutscher, englischer, französischer oder italienischer Sprache abgefaßte Originalarbeiten werden druckfertig und möglichst in Schreibmaschinenschrift erbeten. Aufnahme von Tabellen und Abbildungen unterliegt jeweils vorheriger Vereinbarung.

„Kurze Mitteilungen" sind solche Veröffentlichungen in den vorerwähnten Sprachen, die im allgemeinen einen Umfang von vier Druckseiten nicht übersteigen. Sie erscheinen möglichst schon im nächsten Heft.

Die „Besprechungen" erscheinen nur in deutscher Sprache.

Herausgeber: Prof. Dr. E. GÄUMANN, Zürich 6, Universitätsstraße 2, Prof. Dr. M. KLINKOWSKI, Aschersleben, Ermslebener Str. 52, und Prof. Dr. H. RICHTER, Berlin-Dahlem, Königin-Luise-Str. 19.

Zusendung der Manuskripte von Originalarbeiten und „Kurzen Mitteilungen" entweder an den Verlag Paul Parey, Berlin SW 61, Lindenstraße 44/47, oder an einen der drei Herausgeber.

Zusendung der „Besprechungen" unmittelbar an Prof. RICHTER, Berlin-Dahlem. Soweit nicht eine Aufforderung der Herausgeber zur Besprechung bestimmter Arbeiten ergangen ist, empfiehlt es sich, Prof. RICHTER vorher von der Absicht der Besprechung zu verständigen.

Honorierung: Das Mitarbeiterhonorar für Originalarbeiten und „Kurze Mitteilungen" beträgt 32,— DM je Druckbogen von 16 Seiten. Bei Beiträgen von mehr als drei Bogen werden nur die ersten drei Bogen honoriert; Dissertationen und Buchbesprechungen sind honorarfrei.

Sonderdrucke: Jeder Mitarbeiter erhält unberechnet 30 Sonderdrucke seines Beitrages (Originalarbeiten und Kurze Mitteilungen). Mehrbedarf gegen Berechnung.

Erscheinungsweise: Die Zeitschrift erscheint in zwangloser Folge. Jährlich erscheinen etwa 10—12 Hefte, von denen 4 einen Band bilden. Jeder Band enthält etwa 30 Druckbogen.

Bezugsbedingungen: Der Preis des Bandes richtet sich nach dem Umfang. Er beträgt je Druckbogen von 16 Seiten etwa 3,50 DM. Die Hefte sind auch einzeln käuflich. Das Abonnement verpflichtet zum Bezug eines ganzen Bandes. Es verlängert sich jeweils, falls nicht spätestens unverzüglich nach Eingang der letzten Lieferung des berechneten Bandes Abbestellung erfolgt.

Abonnementspreis dieses Heftes 27,40 DM **Einzelpreis 30,— DM**

Aus der Biologischen Zentralanstalt
der Deutschen Akademie der Landwirtschaftswissenschaften zu Berlin,
Institut für Phytopathologie Aschersleben
(Direktor: Prof. Dr. M. Klinkowski)
und
dem Justus-v.-Liebig-Institut für organische Chemie
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. W. Langenbeck)

Biochemische Untersuchungen über den Stoffwechsel gesunder und brennfleckenkranker Bohnen

II. Untersuchungen über sekundäre Pflanzenstoffe

Von

H. Herzmann

Mit 13 Abbildungen

Inhalt: 1. Analytische Untersuchungen. a) Qualitative Befunde; b) Quantitative Quercetinbestimmung; c) Quantitative Ligninbestimmung; d) Die Verteilung der Substanzen in den Organen gesunder und kranker Pflanzen. — 2. Über die Melaninbildung. — 3. Die sekundären Pflanzenstoffe als Effektoren der Enzymwirkung. a) Die Aktivierung der Peroxydase; b) Die Hemmung der Katalase. — 4. Diskussion der Versuchsergebnisse. a) Verteilung sekundärer Pflanzenstoffe in der gesunden und in der kranken Pflanze; b) Die Melaninbildung; c) Die sekundären Stoffe als Effektoren der Enzymwirkung. — Zusammenfassung. — Summary. — Literaturverzeichnis.

Im I. Teil (Herzmann 1958) war ein Überblick über den Gehalt gesunder und brennfleckenkranker Bohnen an Zuckern, Stickstoffverbindungen und Carbonsäuren gegeben worden. Weiterhin war über die Aktivität einiger Oxydationsfermente berichtet worden. Nachstehend folgen Untersuchungen über sekundäre Pflanzenstoffe.

1. Analytische Untersuchungen

a) Qualitative Befunde

Von der großen Zahl der sekundären Pflanzenstoffe sollen uns hier nur die stickstofffreien aromatischen Verbindungen interessieren. Hierzu gehören u. a. die Phenylpropanabkömmlinge (C_6-C_3-Körper) sowie aus der umfangreichen Gruppe der zellsaftlöslichen Pigmente die Anthocyane und

Anthoxanthine. Um zu prüfen, ob bzw. welche Substanzen dieser Klasse in gesunden und brennfleckenkranken Bohnenpflanzen vorhanden sind, stellten wir methanolische Extrakte her und chromatographierten aufsteigend in Butanol-Eisessig-Wasser = 4 : 1 : 5 organische Phase (BEW) (PARTRIDGE 1948). Fast alle diese Verbindungen kann man durch ihre mehr oder minder starke Fluoreszenz unter der UV-Lampe erkennen, was ihre Charakterisierung ungemein erleichtert. Viele dieser Stoffe wechseln außerdem nach Bedampfen mit Ammoniak ihre Fluoreszenzfarben. Wir konnten feststellen, daß die Bohnenextrakte eine Anzahl von Verbindungen dieses Typs enthalten. Die Infektion verursacht quantitative und qualitative Unterschiede im Gehalt der Bohnen an einigen dieser Substanzen. Zur Erleichterung ihrer Identifizierung wurden diese Stoffe mit einer größeren Anzahl von in Frage kommenden Substanzen verglichen. Hierbei bedienten wir uns folgender Reagenzien:

Eisen^{III}-chlorid: 2 % (methanolische Lösung) (BATE-SMITH und WASHALL 1950)
Natriumnitrit: 2 % in 2,5 % Essigsäure, anschließend 0,5 n methanolische Kalilauge (HERRMANN 1955 a)
Diazotierte Sulfanilsäure in Alkohol, anschließend 2 n Sodalösung
Natriumjodat: 5 % in aqua dest.
Silbernitrat: (0,1 n) + Ammoniak (5 n) 1 : 1 (BATE-SMITH und WASHALL 1950)
Bleiacetat: 10 % in aqua dest. + 0,1 % Eisessig
Bleiacetat: 10 % in aqua dest. + 5 % konz. Ammoniak

Die 0,1 %igen Lösungen der Substanzen in Methanol wurden in angemessenen Mengen (100 bis 200 γ) auf Filtrierpapier gebracht und mit den Reagenzien besprüht. Lediglich die Reaktion gegen Bleiacetat wurde an den Lösungen der Substanzen geprüft, weil hierbei auch evtl. entstehende Niederschläge beobachtet werden sollten. Über diese Vergleichssubstanzen und die Reaktionen gibt Tabelle 1 Auskunft.

Die Extrakte stellten wir aus frischem oder getrocknetem Pflanzenmaterial her. Wichtig schien uns, die lebenden Pflanzenteile so schnell wie möglich abzutöten, damit keine Veränderungen der Inhaltsstoffe durch zelleigene Fermente vor sich gehen konnten. Wir trugen entweder die gewaschenen und grob zerkleinerten Teile schnell in siedendes Methanol (80 %ig) ein oder homogenisierten unter Zusatz von Kaliumcyanid (10 ml 0,01 n). Zum Trocknen brachten wir die Pflanzenteile in einen auf 150 °C erwärmten Trockenschrank und ließen sie bei dieser Temperatur 10 Minuten. Die Proben kühlten dann über Nacht langsam ab und waren am anderen Morgen trocken. Wir pulverisierten das Material, extrahierten dann mehrfach, mindestens dreimal, mit siedendem 80 %igem Methanol und engten auf ein bestimmtes Volumen ein. Die Extrakte aus frischem Material wurden nach dem Abtöten entsprechend behandelt. Sie sind grün gefärbt und enthalten außer den gewünschten Stoffen noch viele Substanzen (Zucker, Stärke, Chlorophyll, Aminosäuren u. a.), die teilweise zu Störungen Anlaß geben können. Bei der Aufarbeitung größerer Mengen an Pflanzenmaterial schlossen wir deshalb noch eine Reinigung über die Salze bzw. Farblacke des Bleies an. Die nach Extraktion erhaltenen, nur mäßig eingeengten Lösungen wurden zur Fällung mit einer gesättigten, ammoniakalischen Lösung von Blei-

Tabelle 1

Reaktionen der Vergleichssubstanzen

	diaz. Sulf. S.	$NaJO_3$	$FeCl_3$ (methanolisch)	$NaNO_2$ + methanol. KOH	$AgNO_3$ + NH_3	Pb-Acetat	Pb-Acetat + NH_3
p-Cumarsäure	rot	gelb	rotorange	hellgelb	—	—	gelb
p-Cumarsäure-methylester	orange	gelbbraun	hellgrau	gelb	—	—	gelb
Tyrosin	—	rosa	—	—	—	—	weiß
Guajakol	hellrot	rot	orange	—	+	—	weiß
Orcin	orange	hellrosa	gelb	—	—	—	weiß
Ferulasäure	rotviolett	orange	orange	gelbbraun	+	gelb	gelb
Brenzkatechin	braunrot	braun	grünblau	braunrot	+++	weiß	weiß
Protocatechusäure	orange	braungelb	grünlich	rot	++	weiß	weiß
Kaffeesäure	braun	gelbbraun	grünlich	braunrot	+++	gelb	gelb
Kaffeesäure-methylester ..	gelbbraun	braun	grüngrau	orange	++	gelb	gelb
Chlorogensäure	hellbraun	braun	grün	rot	+++	gelb	gelb
Dopa	rötlich	braun	oliv	braunrot	+++	—	weiß
Quercetin	orange	oliv	grün	schwach gelb	+	orange	orange
Rutin	orange	dunkeloliv	grün	orange	+	gelb	stark gelb
Resorcin	bräunlich	rosa	schwach bräunlich	braungrau	++	—	weiß
Hydrochinon	rötlich	violett	—	violett	+++	—	grau
Phloroglucin	rotbraun	—	hellgelb	gelbgrün	+	—	weiß
Gallussäure	oliv	rotbraun	blauviolett	braun	+++	hellgelb	hellgelb
Trimethyl-gallussäure	—	—	gelborange	schwach gelb	—	—	weiß
Tannin	hellbraun	rotbraun	blauviolett	braun	++	weiß	hellgelb

acetat im Überschuß versetzt. Wir ließen unter mehrmaligem Umrühren mehrere Stunden stehen und zentrifugierten dann die gelblichen Niederschläge ab. Der Überstand wurde auf vollständige Fällung geprüft, das Zentrifugat mit 1 %iger ammoniakalischer Bleiacetatlösung gewaschen und wieder zentrifugiert. Diese Niederschläge können beliebig lange aufbewahrt werden. Zur Freisetzung der Anthoxanthine und Phenole wird in warmem Wasser aufgeschlämmt und Schwefelwasserstoff eingeleitet. Schwarzes Bleisulfid fällt aus. Nach vollständiger Zersetzung wird von diesem abgesaugt und mehrmals mit warmem, verdünntem Methanol nachgewaschen. Das Filtrat wird eingeengt, wobei gleichzeitig der gelöste Schwefelwasserstoff vertrieben wird. Kolloidales Bleisulfid, das durch die Fritte gelaufen war, fällt jetzt mit aus und wird entfernt. Um stärker einzuengen, wird schwach alkalisch gemacht, damit die Phenole nicht im Wasserdampf abdestillieren. Die Extrakte wurden dann mit 80 %igem Methanol auf bestimmte Volumina gebracht und zum Chromatographieren verwendet. Auf Chromatogrammen von Extrakten aus befallenen Blättern fielen sechs Substanzen im UV besonders auf (Tab. 2).

Tabelle 2

Rf-Werte und Reaktionen der Substanzen aus kranken Blättern
Lösungsmittel: BEW

Stoff Nr.	Rf-Wert	Tageslicht		UV		$FeCl_3$ meth.	diaz. Sulfanilsäure
		ohne NH_3	mit NH_3	ohne NH_3	mit NH_3		
1	0,57	schwach gelb	schwach gelb	braun	gelb	grün	orange
2	0,66	—	dto.	blau	gelbgrün	grünblau	hellbraun
3	0,75	—	dto.	schwach violett	blaugrün	blaugrau	orangerot
4	0,82	—	—	blau	hellblau	grün	rotbraun
5	0,90	—	—	—	violett	gelborange	rötlich
6	0,92	—	—	violett	heller violett	—	—

Zur Identifizierung möglichst vieler dieser Substanzen trennten wir eine nach der anderen chromatographisch ab. Die Substanz 1 (Rf-Wert: 0,57 in BEW) zeigte unter der Quarzlampe dunkelbraune Farbe, die nach Bedampfung mit Ammoniak in kräftiges Gelb umschlug. Wir trennten 2 ml des Blattextraktes auf Schleicher-Schüll-Papier Nr. 2071, markierten den Fleck unter der UV-Lampe, schnitten ihn aus und eluierten mit 80 %igem Methanol erschöpfend. Die gelbbraune methanolische Lösung wurde eingeengt und dann im Vakuum zum Trocknen gebracht. Die bräunliche Kruste wurde mit 10 ml 2 n Schwefelsäure aufgenommen und zur Hydrolyse zwei Stunden im Rückfluß gekocht. Die Lösung war nach der Hydrolyse stärker gelb gefärbt als vorher. Sie wurde mit Essigester mehrfach ausgeschüttelt, abgetrennt und die Esterlösung mit Wasser gewaschen. Der Ester wurde fast bis zur Trockne abgedampft und mit Methanol aufgenommen. Diese Lösung wurde zur aufsteigenden Chromatographie nach MATTHIAS (1954) verwendet. Als

Lösungsmittel benutzten wir BEW, Essigsäure (15 %ig) und Propanol-Wasser = 19 : 6 und erhielten folgende Rf-Werte und Reaktionen:

BEW	Essigsäure 15 %	Propanol	diazot. Sulf. S.	$FeCl_3$	Pb-Acetat + NH_3
0,78	0,11	0,73	orangerot	grün	orange

Da nach der Hydrolyse ein anderer, und zwar erhöhter Rf-Wert in BEW gefunden wurde, handelt es sich um ein Glykosid, und zwar dem Ausfall der Reaktionen nach um ein Flavonolglykosid, wie wir an der gelbgrünen Fluoreszenz des Aglykons nach Besprühen mit $AlCl_3$ [1 % in Methanol] (Paris 1952) unter der Analysenquarzlampe erkannten. Da wir annahmen, daß es sich bei diesem um Quercetin handeln könne, chromatographierten wir im Gemisch mit dieser Substanz und erhielten stets übereinstimmende Rf-Werte.

Der hydrolytisch abgespaltene Zucker mußte sich in der schwefelsauren Lösung befinden. Wir entsäuerten mit dem Anionenaustauscher Wofatit SBS 400 (OH-Form), chromatographierten in BAW (s. Teil I) und entwickelten mit Anilinphthalat. Das Chromatogramm wies einen Zucker auf; durch Vergleich der Rf-Werte und Mischchromatographie stellten wir fest, daß es sich um Galaktose handelt.

Flavonol-3-glykoside zeigen nach Besprühen mit Aluminiumchlorid (1 % in Methanol) im UV-Licht intensive gelbe Fluoreszenz (Paris 1952). Der Zuckerrest mußte also in 3-Stellung am Quercetinmolekül stehen. Dieser Hinweis lenkte unser Interesse auf ein bekanntes Quercetin-3-galaktosid, das Hyperosid. Dieses findet sich reichlich in Nußbaumblättern [*Juglans regia* L.] (Herrmann 1955 b). Wir trennten einen Extrakt hieraus chromatographisch auf und verglichen mit dem Glykosid aus Bohnenblättern. Die Übereinstimmung der Rf-Werte in 3 Lösungsmitteln (BEW = 0,57, 15 % Essigsäure = 0,41, Essigester-Ameisensäure-Wasser = 10 : 2 : 3 = 0,60) bestätigte unsere Vermutung, daß es sich bei dem Stoff 1 um Quercetin-3-galaktosid, Hyperosid, handelt.

Die Substanz 2 hatte in BEW einen Rf-Wert von 0,66. Das Verhalten unter der Analysenquarzlampe sowie die Reaktionen gegen Eisen^{III}-chlorid und diazotierte Sulfanilsäure wiesen auf Chlorogensäure. Zur Identifizierung eluierten wir den betreffenden Fleck und chromatographierten im Gemisch mit Chlorogensäure. Wir erhielten folgende Rf-Werte:

BEW = 0,66
Essigsäure 15 % = 0,67
Essigsäure 5 % = 0,68
Butanol-Aceton-Wasser (2 : 7 : 1) = 0,32
Essigester-Ameisensäure-Wasser (10 : 2 : 3) = 0,84

Da auch die Reaktionen mit Natriumnitrit, diazotierter Sulfanilsäure und Eisen^{III}-chlorid identisch verliefen, handelt es sich bei dem Stoff 2 tatsächlich um Chlorogensäure (Kaffeesäure-Chinasäureester).

Die Substanz 3 (Rf-Wert BEW = 0,75) fiel besonders durch ihre intensiv blaugrüne Fluoreszenzfarbe nach Bedampfen des Chromatogrammes mit

Ammoniak auf. Diese Farbumschläge sind typisch für Derivate der Zimtsäure, besonders ihre Ester und Laktone (Cumarine). Da Vergleiche mit authentischen Substanzen dieser Art nicht zum Ziel führten, trennten wir die Substanz wie üblich chromatographisch ab und stellten mit der erhaltenen chromatographisch einheitlichen Lösung ihre Rf-Werte in folgenden Lösungsmitteln fest:

BEW = 0,75 bis 0,76
Essigsäure 15 % = 0,70 bis 0,71
Essigsäure 2 % = 0,65
Essigester-Ameisensäure-Wasser = 0,95
Aqua dest. = 0,81
Butanol-Ameisensäure-Wasser = 0,86

Um über funktionelle Gruppen Angaben zu erhalten, prüften wir mit folgenden Reagenzien:

Eisen^{III}-chlorid (methanolische Lösung) = blaugrau
Silbernitrat + Ammoniak = braun
Natriumnitrit + Kalilauge = gelbbraun
diazotierte Sulfanilsäure = rotbraun
Aluminiumchlorid (1 % methanolische Lösung) = gelbgrün

Einen weiteren Hinweis erhielten wir, als wir das UV-Spektrum der Substanz aufnahmen. Wir verwendeten hierzu eine Lösung in Methanol, die durch zweimaliges Chromatographieren gereinigt war (s. Abb. 1). Der Anstieg von 400 mμ bis zum ersten Maximum bei 328 mμ wies auf Abkömmlinge der Kaffeesäure oder der p-Cumarsäure hin. Den Verlauf der Absorptionskurve können wir allerdings nicht als völlig gesichert annehmen, da keine kristalline Substanz verwendet wurde. Alle diese Befunde wiesen auf ein Derivat der Mono- oder Dioxyzimtsäure hin, wahrscheinlich einen Ester. Wir hydrolysierten den Stoff deshalb mit 2 n Natronlauge, säuerten mit Salzsäure schwach an und extrahierten den vermuteten Zimtsäureabkömmling mit Äther. Dieser wurde entfernt und der Rückstand mit Methanol aufgenommen. Die chromatographische Untersuchung ergab folgende Rf-Werte:

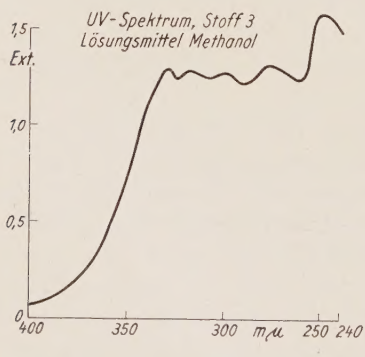


Abb. 1. UV-Absorptionsspektrum des Stoffes 3

BEW = 0,91
Essigsäure 15 % = 0,60
Essigsäure 5 % = 0,41

Vergleiche mit authentischer p-Cumarsäure ergaben Übereinstimmung, es mußte sich also um einen Ester dieser Säure handeln. Um völlige Gewißheit zu haben, stellten wir die Hydroxamsäure nach BAYER (1957) her. Die aus Chromatogrammen extrahierte Methanollösung des Esters wurde fast bis zur Trockne eingeengt, mit 10 ml Äther aufgenommen und mit Natriumsulfat getrocknet. Wir gaben dann 2 ml Hydroxylaminreagenz hinzu, das

unmittelbar vor Gebrauch durch Mischen gleicher Teile einer 5 %igen methanolischen Lösung von Hydroxylaminhydrochlorid und einer 12,5 %igen methanolischen Natronlauge bereitet wurde. Das verschlossene Reaktionsgefäß wurde 20 Minuten bei 25 °C stehengelassen und unmittelbar darauf mit konzentrierter Salzsäure neutralisiert. Wir saugten durch eine Fritte (G 4) ab und chromatographierten 20 μl der schwach gelben ätherischen Lösung aufsteigend im BEW. Nach Besprühen des Chromatogrammes mit einer 1 %igen methanolischen Lösung von Eisen^{III}-chlorid erhielten wir eine violett gefärbte Zone mit einem durchschnittlichen Rf-Wert von 0,74. Zum Vergleich zogen wir die Hydroxamsäure aus p-Cumarsäuremethylester (Helferich und Vorsatz 1935) heran und erhielten den gleichen Rf-Wert. Nachdem wir so über die Natur der Säure Klarheit gewonnen hatten, mußte sich die alkoholische Komponente noch in dem wäßrigen Rückstand der Hydrolyse befinden. Die mannigfachen Anhaltspunkte, die wir über die Natur des Stoffes gewonnen hatten, wiesen auf die Chinasäure als alkoholische Komponente hin. Der Vergleich mit dem Methyl- und Äthylester war negativ verlaufen.

Dagegen hatten Schütte, Langenbeck und Böhme (1957) über das Vorkommen des Chinasäureesters in der Mutante *nivea* von *Antirrhinum majus* L. berichtet und ganz ähnliche Rf-Werte und Reaktionen erhalten.

Nach erneuter alkalischer Hydrolyse einer chromatographisch angereicherten Lösung des Stoffes und Extraktion der Cumarsäure mit Äther entzogen wir die Base durch einen Kationenaustauscher (Wofatit KPS 200, H-Form) und chromatographierten zweidimensional in Äthanol-Ammoniak-Wasser = 80 : 4 : 14 und Butanol-Ameisensäure-Wasser = 77 : 11 : 12 (siehe Teil I). Wir erhielten nach dem Entwickeln mit dem Anilin-Glukose-Reagenz einen Fleck, der nach Vergleich und Mischchromatogramm zur Chinasäure gehörig erkannt wurde. Damit hatten wir den Stoff 3 als p-Cumarsäure-Chinasäureester identifiziert.

Die Substanz 4, Rf-Wert 0,82 in BEW, trennten wir wieder papierchromatographisch von den anderen Substanzen und erhielten mit dem Eluat folgende Rf-Werte:

n-Propanol-Wasser (19 : 6) = 0,79
Essigsäure 15 % = 0,45
Essigsäure 5 % = 0,38

Diese Werte sowie die Reaktionen mit Eisen^{III}-chlorid, diazotierter Sulfanilsäure und Natriumnitrit wiesen auf Kaffeesäure. Wir verglichen mit authentischer Substanz (Posner 1910) und erzielten Übereinstimmung auch im Mischchromatogramm.

Die Substanz 5 (Rf-Wert in BEW = 0,90) fiel dadurch auf, daß sie erst nach Bedampfen des Chromatogrammes mit Ammoniak sichtbar wurde. Wir stellten nach vorheriger chromatographischer Abtrennung noch folgende Rf-Werte fest:

Essigsäure 15 % = 0,60
Essigsäure 5 % = 0,41
Propanol-Wasser (19 : 6) = 0,85

Hiernach sowie nach dem Ausfall der Reaktionen gegen Eisen^{III}-chlorid und diazotierte Sulfanilsäure vermuteten wir p-Oxyzimtsäure (p-Cumarsäure). Wir setzten die authentische Substanz dem Eluat zu und erhielten stets identische Rf-Werte.

Wir fanden also sowohl die p-Cumarsäure und Kaffeesäure als auch deren beide Chinasäureester gemeinsam in unserem Pflanzenmaterial vor.

Der Stoff 6 (Rf-Wert in BEW = 0,95) war an seiner violetten Fluoreszenzfarbe erkennbar, die sich bei Bedampfung mit Ammoniak noch verstärkte. Wir trennten den Stoff papierchromatographisch möglichst ab und stellten folgende Rf-Werte fest:

Essigsäure 15 % = 0,12
Essigsäure 2 % = 0,05
Phenol (4 : 1) = 0,85
Butanol-Ammoniak-Wasser (84 : 2 : 14) = 0,85
Äthanol-Ammoniak-Wasser (80 : 4 : 16) = 0,57

Diese Werte zeigen, daß es sich um einen hydrophoben Stoff handeln muß, wir prüften noch auf folgende Reaktionen:

diazotierte Sulfanilsäure = negativ
Eisen^{III}-chlorid = negativ
Natriumnitrit = negativ
Millons Reagenz = orange (schwach positiv)
Bleiacetat = gelber Niederschlag

Nach dem Ausfall dieser Reaktionen waren wir nicht in der Lage, den Stoff näher zu klassifizieren. Wir hydrolysierten deshalb eine Probe mit der gleichen Menge 4n Salzsäure eine Stunde. Nach Aufarbeitung lag der Stoff unverändert vor. Auch wiederholte Hydrolyseversuche mit stärkerer Säure (bis 6n) erzielten kein anderes Ergebnis. Dagegen führten alkalische Hydrolysen mit 2n Natronlauge zum Ziel. Nach einstündigem Kochen, Neutralisieren, Extrahieren mit einem Gemisch von Essigester und Äther und Chromatographie war ein neuer Stoff durch hellblaue Fluoreszenz nachweisbar, der andere Rf-Werte hatte als die Ausgangssubstanz.

BEW = 0,91
Essigsäure 15 % = 0,40
Essigsäure 5 % = 0,28
Essigsäure 2 % = 0,235
Propanol : Wasser (19 : 6) = 0,88

Wir prüften mit Eisen^{III}-chlorid, diazotierter Sulfanilsäure und Silbernitrat, es fand jedoch keine Reaktion statt. Hieraus ergeben sich weder Hinweise auf funktionelle Gruppen noch auf die Natur der Ausgangssubstanz. Wir nahmen deshalb an, daß es sich bei dem Hydrolysat zwar wahrscheinlich um ein Bruchstück, jedoch ein Artefakt handelt. Der Stoff 6, der sich besonders in den Randzonen der Melaninflecke bildet, stellt also eine höhermolekulare kondensierte Substanz dar, bei der, wie die Untersuchungen zeigten, funktionelle reaktionsfähige Gruppen nur noch wenig vorhanden sind.

b) Quantitative Quercetinbestimmung

Von Extrakten gesunder und kranker Fiederblätter und Früchte (enthaltend 2 g Material in 10 ml Lösung) wurden je 8 Streifenchromatogramme

in BEW angefertigt. Die unter der UV-Lampe markierten Flecke des Quercetin-Galaktosids wurden ausgeschnitten und mit 70 %igem Alkohol erschöpfend eluiert. Wir engten dann auf ein kleines Volumen ein und hydrolysierten mit 4n Salzsäure. Die zum Teil kräftig gelbgefärbten Lösungen wurden mit Essigester ausgeschüttelt, fast bis zur Trockne eingeengt und in 10 ml Methanol aufgenommen. Wir photometrierten mit dem Pulfrich-Photometer (Filter S 42) und werteten die Ergebnisse mittels einer Eichkurve in mg/g Frischgewicht aus.

Ergebnisse:

gesunde Blätter	=	8,4 mg
kranke Blätter	=	12,2 mg
gesunde Früchte	=	1,38 mg
kranke Früchte	=	≈ 0,2 mg

Diese Ergebnisse decken sich mit den chromatographischen Befunden.

c) Quantitative Ligninbestimmung

Da Zimtsäurederivate Vorstufen bei der Biosynthese des Lignins sind, haben wir noch mehrere quantitative Ligninbestimmungen ausgeführt; die Isolation nahmen wir nach Freudenberg (1955) vor. Es resultiert ein hellbraunes Rohlignin. Wir untersuchten die Stengel gesunder und kranker Pflanzen und stellten fest, daß in gesunden Stengelteilen stets mehr Lignin enthalten ist:

Abb. 2. Stengelschnitte, Vergrößerung 105 ×, Lignin enthaltende Zonen dunkel; oben gesunder, unten kranker Stengel

	1. Bestimmung	2. Bestimmung
gesunde Stengel:	42 mg	62 mg/g Frischgewicht
kranke Stengel:	34 mg	43 mg/g Frischgewicht

Diese Ergebnisse decken sich mit den Befunden bei Schnitten gesunder und kranker Stengel. Nach Anfärben mit Phloroglucin (kaltgesättigte Lösung in konzentrierter Salzsäure) waren unter dem Mikroskop deutliche Unterschiede zu erkennen (Abb. 2). Die Lignin enthaltende Zone der infizierten Stengelteile ist deutlich schwächer ausgebildet.

d) Die Verteilung der Substanzen in den Organen der gesunden und der kranken Pflanze

Im Hinblick auf ihre Funktion beim Infektionsprozeß interessierte die Verteilung der sekundären Stoffwechselprodukte in den Früchten und Blättern der gesunden und der kranken Pflanzen. Wir chromatographierten zweidimensional in BEW und 5 %iger Essigsäure und trugen von Blattextrakten entsprechend 0,1 g Pflanzenmaterial und von Früchten entsprechend 0,5 g Frischgewicht auf. Die Laufstrecke in BEW betrug 30, die in Essigsäure 20 cm. Der Vergleich der Chromatogramme unter der UV-Lampe vor und nach Bedampfung mit Ammoniak ergab folgendes Ergebnis (Abb. 3 und 4). In den

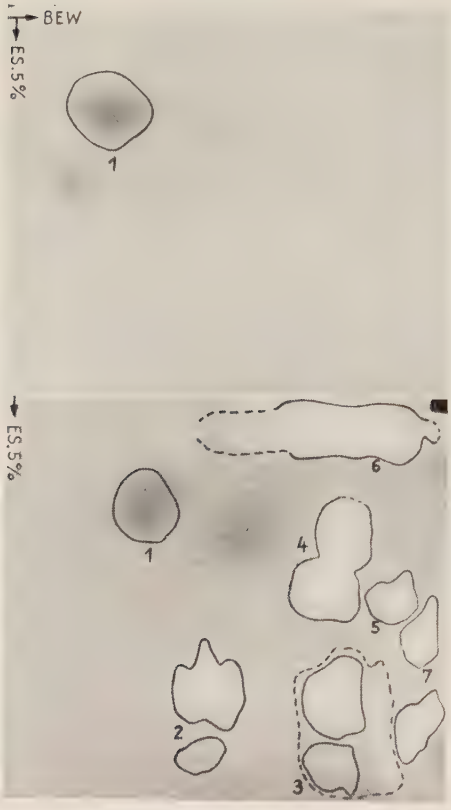


Abb. 3. Vorkommen der sekundären Pflanzenstoffe, Aufnahmen im UV unter Ammoniakbedampfung eines Ausschnittes der zweidimensionalen Papierchromatogramme (1. BEW; 2. Essigsäure 5 %); oben gesunde, unten kranke Früchte; 0,5 g; 1 Quercetingalaktosid, 2 Chlorogensäure, 3 p-Cumarsäurechinasäureester, 4 Kaffeesäure, 5 p-Cumarsäure, 6 kondensierter Stoff, 7 p-Cumarsäuremethylester

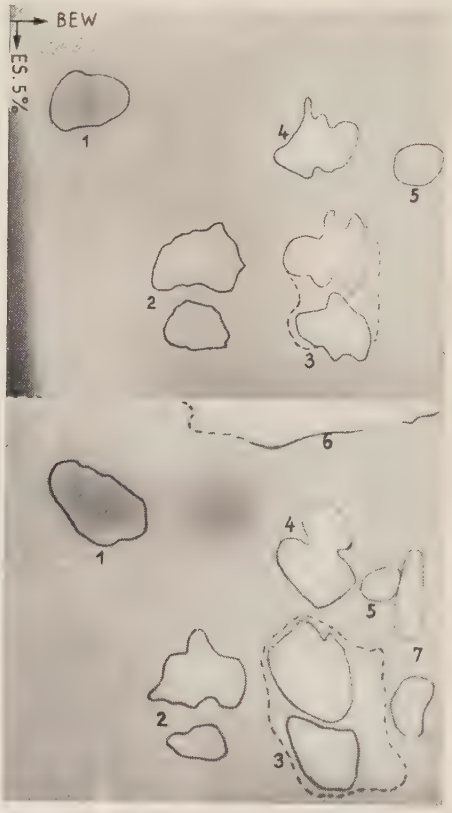


Abb. 4. Vorkommen der sekundären Pflanzenstoffe, Aufnahmen im UV unter Ammoniakbedampfung eines Ausschnittes der zweidimensionalen Papierchromatogramme (1. BEW; 2. Essigsäure 5 %); oben gesunde, unten kranke Blätter; 0,1 g; 1 Quercetingalaktosid, 2 Chlorogensäure, 3 p-Cumarsäurechinasäureester, 4 Kaffeesäure, 5 p-Cumarsäure, 6 kondensierter Stoff, 7 p-Cumarsäuremethylester

gesunden Früchten war nur das Quercetinglykosid nachweisbar. Demgegenüber enthalten die kranken Früchte eine größere Anzahl von Stoffen (Abb. 3). Außer dem Quercetinglykosid, das in Übereinstimmung mit der quantitativen Analyse in bedeutend geringerer Menge enthalten ist, stellten wir noch folgende Stoffe fest: Chlorogensäure, p-Cumarsäure-Chinasäureester, Kaffeesäure, p-Cumarsäure, den kondensierten Stoff 6 und p-Cumarsäuremethylester. Bei einigen Zimtsäurederivaten sind cis-trans-Isomere wahrnehmbar (Williams 1955), der obere, meist stärkere Fleck stellt die trans-, der untere die cis-Form dar.

Im Gegensatz zu den Früchten enthalten die Blätter die erwähnten Stoffe in weitaus größerer Menge. Wir trugen deshalb nur ein Fünftel der Menge an Extrakt auf (= 0,1 g). In den gesunden Blättern stellten wir folgende Substanzen fest: Quercetingalaktosid, Chlorogensäure, p-Cumarsäure-Chinasäureester, Kaffeesäure und p-Cumarsäure. Der Gehalt der befallenen Blätter an diesen Stoffen ist größer, bis auf Chlorogensäure. Außerdem enthalten sie noch den kondensierten Stoff 6 und p-Cumarsäuremethylester (Abb. 4).

2. Über die Melaninbildung

Aus den Fruchtschalen der Pferdebohnen *(Vicia faba* L.) hatte Guggenheim (1923) das 3,4-Dioxyphenylalanin (Dopa) isoliert, das dort für die Schwärzung der Samenschalen im Herbst verantwortlich ist. Rapfr (1926) hatte später erkannt, daß Dopa das erste Zwischenprodukt bei der vom Tyrosin ausgehenden Melaninbildung ist. Wir versuchten deshalb, Tyrosin oder Folgeprodukte in den Blättern und Früchten der Bohnenpflanzen nachzuweisen. Wie die papierchromatographischen Untersuchungen zeigen, ist Tyrosin nur in den Blättern junger Pflanzen in geringen Mengen enthalten. In den Blättern oder Früchten älterer Pflanzen war es nicht mehr nachweisbar. Darauf prüften wir auf Dopa, das nächste Folgeprodukt.

Die Rf-Werte von Dopa sind folgende:

in Phenol : Wasser 4 : 1 = 0,40 und in
Propanol : Wasser 19 : 6 = 0,48.

Mit Ninhydrin ergibt es graubraune Flecke mit einer auffälligen hellgelben Randzone, was die Unterscheidung von den anderen Aminosäuren erleichtert. Dieser gelbe Rand zeigt Oxydationsprodukte des Dopa an. Ist die Dopalösung nicht ganz frisch und enthält deshalb mehr derartiger Oxydationsprodukte, so tritt ein intensiv gelber Streifen über dem Dopafleck auf. (Abb. 5). Oxydiert man eine Dopalösung enzymatisch oder mit Silberoxyd, so kann auf dem Chromatogramm nur noch dieser gelbe Fleck, der einen höheren Rf-Wert in Phenol hat, wahrgenommen werden.

Welches Folgeprodukt für diese Färbung verantwortlich ist, können wir noch nicht sagen; es muß sich jedoch um einen Stoff ähnlicher Konstitution handeln, da größere Veränderungen am Molekül stärkere Verschiebungen des

Rf-Wertes nach sich ziehen würden. Durch diese Färbung ist es möglich, noch etwa 3 bis 5 γ Dopa oder seiner Oxydationsprodukte zu erkennen. Außerdem ist diese Methode empfindlicher als der Nachweis der phenolischen OH-Gruppen. Trotz aller dieser Möglichkeiten gelang es uns nicht, Dopa in gesunden oder kranken Pflanzen nachzuweisen. Wir müssen also annehmen, daß es darin nicht vorkommt.

Abb. 5. 1 Phenylalanin, 2 Tyrosin, 3 Dopa. Über dem Dopafleck der hellgelbe Streifen (im Chromatogramm bedeutend stärker sichtbar)

Die Melaninbildung muß also von einer anderen Substanz ausgehen. WAGGONER und DIMOND (1956), SHIROYA, SHIROYA und HATTORI (1955) und andere Bearbeiter vermuten, daß Phenole bzw. Phenolcarbonsäuren für die Braunfärbung verantwortlich gemacht werden können. In den Blättern der Bohne kommen als mögliche Substrate für die Phenoloxydase oder Peroxydase Kaffeesäure und Chlorogensäure in Frage. — Da eine chemische Untersuchung eines so hochkondensierten Stoffes, wie es das Melanin darstellt, keinen Erfolg erwarten läßt, versuchten wir Zwischenprodukte der Melanogenese aufzufinden. Brennfleckenkranke Früchte zeigten unter der UV-Lampe violett-blaufluoreszierende, im Tageslicht unsichtbare Zonen rund um die Brennflecke. Wir nahmen deshalb an, daß hier am ehesten Vorstufen des Melanins nachweisbar sein würden. Wir präparierten eine größere Zahl dieser Randzonen heraus und extrahierten sie mit verdünntem Methanol. Die Papierchromatographie ergab die Anwesenheit eines im UV hellviolett fluoreszierenden Stoffes, der Substanz 6. Ihre Untersuchung hatte jedoch ergeben, daß es sich um einen kondensierten Stoff mit wenig funktionellen Gruppen handeln muß, was keine Rückschlüsse auf Vorstufen zuläßt.

Da dem Parasiten zweifellos eine bedeutende Funktion bei der Melaninbildung zufällt, untersuchten wir, inwieweit er in der Lage ist, ihm angebotene Substrate zu verarbeiten und umzusetzen. Wir homogenisierten 25 g Blätter mit heißem Wasser, klärten durch Abpressen und Zentrifugieren, setzten noch 5 g Glukose zu und füllten auf 250 ml auf. Je 25 ml füllten wir in Erlenmeyerkolben, sterilisierten im Autoklaven, beimpften mit den Sporen von *Colletotrichum lindemuthianum* und bebrüteten bei 30 °C. Eine Probe behielten wir zurück, versetzten sie mit der gleichen Menge Methanol und stellten nach Chromatographie fest, daß Chlorogensäure, Kaffeesäure, p-Cumarsäurechinylester und in geringer Menge p-Cumarsäure vorhanden waren. Nach 14 Tagen, der Pilz hatte mehrere Kolonien von etwa 2 cm Durchmesser gebildet, kochten wir die Kultur kurz auf, setzten die gleiche Menge Methanol zu und filtrierten. Im Extrakt fehlten jetzt alle erwähnten Substanzen. Dafür trat, wie wir durch papierchromatographische Untersuchungen feststellten, ein neuer Stoff auf.

Rf-Werte in						UV	
						NH_3	ohne NH_3
BEW	Prop.	Essig 15 %	Essig-ester Am.-Sre.	But.-Aceton	But. Am.-Sre. Wasser	blau	—
0,93	0,91	0,71 0,83	0,93	0,98	0,96		

Diazotierte Sulfanilsäure gab eine orange und Eisen[III]-chlorid eine hellbraune Färbung. Wir stellten durch Vergleich mit authentischer Substanz fest, daß es sich um p-Cumarsäuremethylester handelt. Etwas mehr Cumarester war noch 3, 4 und 6 Wochen nach Beimpfung nachweisbar, jedoch kein weiterer Stoff.

Auf Grund dieses Ergebnisses war es uns nun möglich, kleine Mengen des p-Cumarsäuremethylesters durch zweidimensionale Papierchromatographie in Extrakten kranker Blätter und Früchte festzustellen.

3. Die sekundären Pflanzenstoffe als Effektoren der Enzymwirkung

a) Die Aktivierung der Peroxydase

Bei Versuchen über die Oxydation von 3,4-Dioxyphenylalanin (Dopa) zu Melanin oder möglichen Vorstufen fiel uns auf, daß bestimmte Phenole und Phenolcarbonsäuren die Oxydation von Dopa beschleunigen, während andere nicht oder nur wenig wirkten. Wir prüften darauf eine größere Anzahl dieser Substanzen, von denen wir einige in den Blättern der gesunden und brennfleckenkranken Bohnenpflanze nachgewiesen hatten. Bei der Oxydation von Dopa entsteht als erstes sichtbares Produkt eine rote Substanz, die nach Raper (1927) das o-Chinon der Dihydroindol-α-carbonsäure (IV) ist (Abb. 6).

Während die enzymatische Oxydation und auch die Bildung des Indolringes schnell vonstatten gehen (Lerner 1953), bleibt der rote Stoff, auch Dopa-Chrom genannt, länger bestehen. Er geht langsam unter Kohlendioxydabgabe, Oxydation und Kondensation über braune Zwischenstufen in das schwarze Melanin über. Wir konnten so die Bildung des Dopa-Chroms am Photometer längere Zeit hindurch messend verfolgen, ohne befürchten zu müssen, daß die Ergebnisse durch Folgereaktionen verfälscht werden. Die Zeit, in der die Beobachtung der fortschreitenden Oxydation möglich ist, richtet sich nach der Aktivität des Enzympräparates.

Die Enzympräparate gewannen wir zunächst aus Bohnenblättern (s. Teil I), später verwendeten wir auch Meerrettich *(Cochlearia armoracia* L.). Jeder Ansatz bestand aus 5 mg Präparat, gelöst in 5 ml Wasser, 0,4 ml Wasserstoffperoxyd (0,1 %ig), 7,8 mg ($= 4 \times 10^{-5}$ Mol) DL-Dopa in 8 ml Wasser und 5 ml m/15 Phosphatpuffer (pH 7,0). Gemessen wurde im Pulfrich-Photometer (Filter S 50 = 500 mμ) gegen eine Blindprobe, die außer Dopa dieselbe Zusammensetzung hatte wie der eigentliche Ansatz.

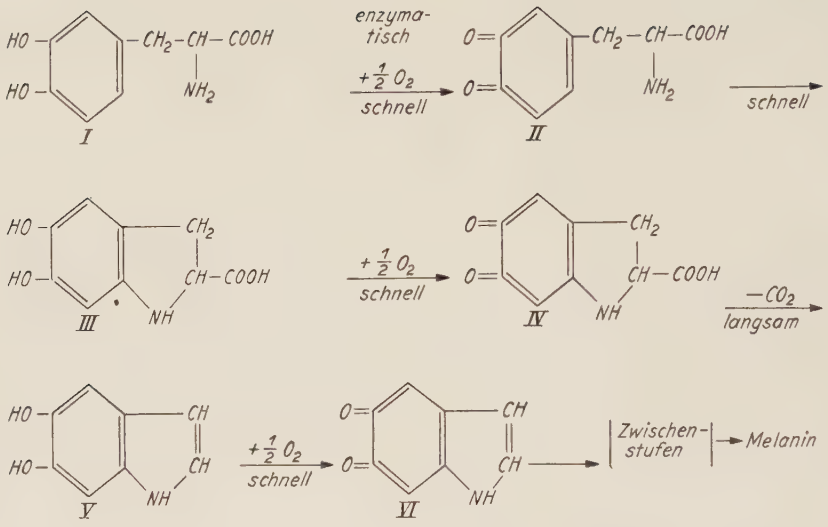


Abb. 6. Melanogenese nach RAPER.
I Dopa
II Dopa-Chinon
III Leuko-Dopa-Chrom
IV Dopa-Chrom
V Dioxindol
VI 5,6-Chinon des Indols

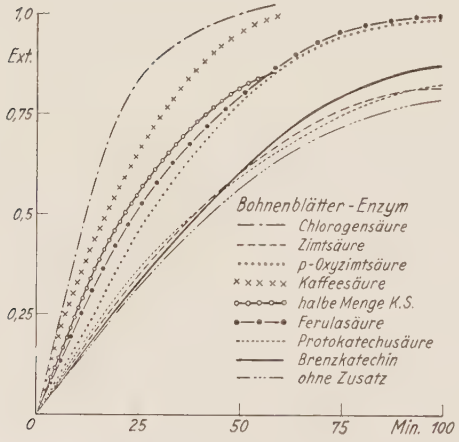


Abb. 7. Enzymatische Oxydation von Dopa, allein und mit Zusätzen (Bohnenblätterenzym)

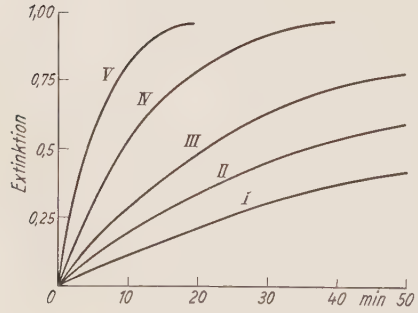


Abb. 8. Enzymatische Oxydation von Dopa, allein und mit Zusätzen (Meerrettichenzym).
I ohne Zusatz
II mit Brenzkatechin
III mit Ferulasäure
IV mit Kaffeesäure
V mit Chlorogensäure

Abbildung 7 gibt den Verlauf der peroxydatischen Oxydation von Dopa allein sowie mit Zusatz von Brenzkatechin, Protokatechusäure, Ferulasäure, Kaffeesäure, p-Oxyzimtsäure, Zimtsäure und Chlorogensäure wieder (je 4×10^{-7} Mol in wäßriger Lösung = 1 % bezogen auf Dopa). Die Messungen mit Zusatz von Chlorogen- und Kaffeesäure brachen wir nach 60, alle anderen nach 100 Minuten ab (Herzmann 1957).

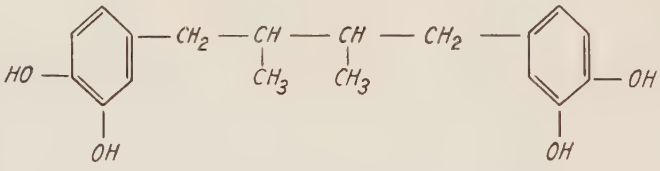
Ähnlich wie Brenzkatechin beschleunigen Protokatechu- und Zimtsäure die enzymatische Oxydation von Dopa nur wenig. In Gegenwart von Chlorogen- bzw. Kaffeesäure verläuft die Oxydation viel schneller, sie ist nach 25 Minuten etwa dreimal so groß wie bei der Oxydation ohne Zusatz. Auch 2×10^{-7} Mol Kaffeesäure bewirken noch eine starke Aktivierung. Eine Zwischenstellung nehmen Ferula- und p-Oxyzimtsäure (p-Cumarsäure) ein. Die Meßwerte, die den Kurven zugrunde liegen, stellen Durchschnitte von mindestens vier Versuchsreihen dar.

Um zu prüfen, ob diese Aktivierung der Peroxydase auch bei anderen Präparaten auftritt oder ob die Ergebnisse speziell an das Bohnenblätterenzym gebunden sind, verwendeten wir in den folgenden Versuchen ein entsprechend hergestelltes Präparat aus Meerrettich. Da dieses viel aktiver war, mußten wir die Versuche nach spätestens 50 Minuten abbrechen. Abbildung 8 zeigt, daß auch das Meerrettichpräparat ganz entsprechend wirkt wie das Enzympräparat aus Bohnenblättern. Kurve I gibt den Reaktionsverlauf ohne Zusatz eines Aktivators wieder. Die Oxydationen verlaufen mit Zusätzen von Zimt-, Dimethoxyzimt- und Protokatechusäure etwa gleich. Alle drei Säuren erhöhen die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Oxydation des Substrates nicht. Kurve II zeigt die Erhöhung der Oxydationsgeschwindigkeit nach Zusatz von Brenzkatechin. Es werden etwa 50 % mehr Dopa als bei I oxydiert. Die Ferulasäure (Kurve III) steigert hier die Oxydationsgeschwindigkeit noch mehr. Die Aktivitäten liegen etwa doppelt so hoch wie bei Kurve I. Die Kurven IV und V zeigen den Verlauf der Oxydation mit Zusatz von Kaffee- bzw. Chlorogensäure. Die Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit ist viel größer als bei den anderen Substanzen; mit Chlorogensäure geht die Oxydation des Dopa 8- bis 10mal schneller als bei der Kontrolle. Wie die Abbildungen 7 und 8 zeigen, sind die Wirkungen bei Verwendung des Meerrettichenzyms zwar ausgeprägter, entsprechen jedoch im qualitativen Verlauf den Ergebnissen, die mit dem Bohnenblätterpräparat gewonnen wurden.

Die aktivierende Wirkung hängt also nicht nur von den beiden orthoständigen Hydroxylgruppen ab, denn dann müßten Brenzkatechin und Protokatechusäure dieselbe Wirkung haben wie Kaffee- und Chlorogensäure. Die Befunde an p-Cumar- und Ferulasäure bestätigten diese Ansicht. Beide Säuren besitzen nur eine bzw. eine freie OH-Gruppe, sind aber trotzdem aktiver als Protokatechusäure. Von großem Einfluß scheint die Acrylsäure-Seitenkette zu sein: Kaffee- und Chlorogensäure sind viel wirksamer als Protokatechusäure. Worauf die unterschiedliche Wirkung der ersten beiden Substanzen zurückzuführen ist, konnte so noch nicht entschieden werden. Kaffee- und Chlorogensäure unterscheiden sich einmal rein formal in der

Länge der Seitenkette. Zum anderen hat die Kaffeesäure eine freie Carboxylgruppe, während diese bei der Chlorogensäure durch Esterbildung abgedeckt ist. Daß die Hydroxyl-Gruppen für die Aktivierung des Enzyms wichtig sind, zeigt der Vergleich der Wirkungen von Zimtsäure bzw. Dimethoxyzimtsäure — p-Cumarsäure bzw. Ferulasäure — Kaffeesäure.

Zur Entscheidung der Frage, weshalb Chlorogensäure stets stärker aktiviert als Kaffeesäure, prüften wir deren Methyl- und Äthylester. Mehrere übereinstimmende Messungen mit Meerrettichenzym ergaben, daß beide eine noch weit größere Wirkung hatten als die Chlorogensäure (Abb. 9). Der Methylester (Kurve VI) erhöhte die Geschwindigkeit der Oxydation des Substrates auf das 15- bis 16fache der Oxydation ohne Zusatz, der Äthylester (Kurve V) auf das 14fache. Kurve IV zeigt zum Vergleich einen Versuch mit Chlorogensäure als Zusatz. Für eine Erhöhung der aktivierenden Wirkung der Kaffeesäure ist es also erforderlich, daß das Hydroxyl der Carboxylgruppe abgedeckt ist. Je kleiner der Rest ist, der hierzu Verwendung findet, um so aktiver ist das gesamte Molekül (Methyl < Äthyl < Chinyl). Zur Bestätigung dieser Annahme prüften wir noch die p-Cumarsäure und ihren Methylester. Auch hier erhöhte der Ester die Reaktionsgeschwindigkeit stets mehr als die freie Säure. Mit Präparaten aus Bohnenblättern erzielten wir stets entsprechende Ergebnisse. — In einem weiteren Versuch prüften wir noch die Nordihydroguajaretsäure (2,3-Dimethyltetramethylendibrenzkatechin).



Diese Substanz zogen wir zum Vergleich heran, weil sie zweimal die für die Aktivierung nötigen 3,4-Dioxygruppen enthält. Ihre aktivierende Wirkung ist tatsächlich viel größer als die des Brenzkatechins und auch noch höher als die der Kaffeesäure (Kurve III), sie entspricht etwa der der Chlorogensäure.

Eine gute Übersicht über die aktivierende Wirkung der Verbindungen gibt Abbildung 10. Nach einer Reaktionszeit von 5 Minuten wurde die Extinktion der Kontrolle ohne Aktivator gleich 1 gesetzt, und die übrigen Werte werden durch Division der Extinktionen errechnet. Die Länge der Balken ist also ein Maß für den Substratumsatz, d. h. für die Wirkung des Aktivators.

Nach RAPER (1926) ist Dopa die erste Zwischenstufe in der vom Tyrosin ausgehenden Melanogenese. Wir versuchten deshalb, das Tyrosin an Stelle von Dopa als Substrat zu verwenden. Da sich Tyrosin bedeutend schlechter löst als Dopa, bestand hier der Ansatz aus 3,6 mg Tyrosin in 13 ml Phosphatpuffer ($= 2 \times 10^{-5}$ Mol). Als Aktivatoren prüften wir Brenzkatechin, Protokatechu-, Ferula-, Kaffee- und Chlorogensäure in Zusätzen von je 1 %

bezogen auf das Substrat (= 2×10^{-7} Mol). Der Ansatz ohne Zusatz färbte sich auch nach längerer Zeit (60 Min.) nur ganz schwach hellgelb. Andere Ergebnisse lassen sich nach den Versuchen über die Spezifität des Bohnenblätterenzyms (s. Teil I) auch nicht erwarten.

Auch die durch den Zusatz der Aktivatoren erreichten Extinktionen waren gering; wir verwendeten sie deshalb in doppelter Menge (= 4×10^{-7} Mol = 2 % bezogen auf das Substrat). Auch jetzt treten nur ganz geringe Wirkungen auf. Brenzkatechin, Kaffee- und Chlorogensäure erhöhten die Oxydationsgeschwindigkeit etwa gleichmäßig um die Hälfte. Entsprechende Ergebnisse erhielten wir auch mit Meerrettichenzym.

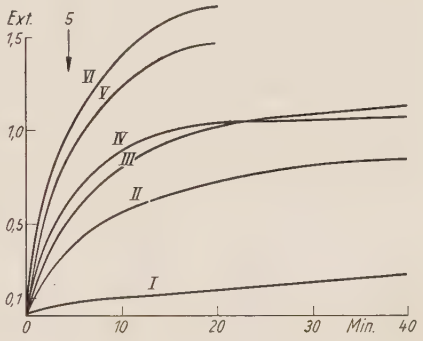


Abb. 9. Enzymatische Oxydation von Dopa allein und mit Zusätzen (Meerrettichenzym).
I ohne Zusatz
II mit Kaffeesäure
III mit Nordihydroguajaretsäure
IV mit Chinylester
V mit Äthylester
VI mit Methylester
} der Kaffeesäure

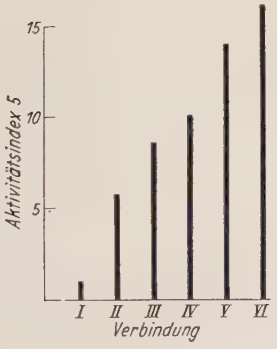


Abb. 10. Vergleich der umgesetzten Mengen an Dopa.
I ohne Zusatz
II mit Kaffeesäure
III mit Nordihydroguajaretsäure
IV mit Chinylester
V mit Äthylester
VI mit Methylester
} der Kaffeesäure

Weiterhin prüften wir Kaffeesäure als Substrat. Die Oxydation der Kaffeesäure geht schon ohne Zusatz sehr schnell, wir setzten deshalb nur 1 mg Enzym pro Ansatz ein. Als Aktivatoren prüften wir Nordihydroguajaretsäure und Kaffeesäuremethylester. Es war keine aktivierende Wirkung festzustellen, die Extinktionen stimmten überein.

Bei Prüfung von p-Cumarsäure als Substrat stellten wir geringe Erhöhung der Oxydationsgeschwindigkeit bei Zusatz von Brenzkatechin, Kaffeesäure und Kaffeesäuremethylester fest. — Diese Befunde decken sich mit Ergebnissen von Herrmann (1954) an der Polyphenoloxydase, wobei er als Substrate p-Oxybenzoe-, Protokatechu- und Gallussäure verwendete. Zusätze

von Brenzkatechin und Kaffeesäure erhöhten hier die Oxydationsgeschwindigkeit um 50 bis 100 %. Bei diesen vergleichsweise geringen Wirkungen werden die Phenole besser als Überträger und nicht als Aktivatoren bezeichnet.

b) Die Hemmung der Katalase

Da die Katalase wie die Peroxydase ein Häminferment ist, untersuchten wir den Einfluß einiger Aktivatoren der Peroxydase auf die katalatische Reaktion.

LÜCK (1957 a) hat kürzlich über die Hemmwirkung von einigen einfachen organischen Säuren berichtet. Wir konnten feststellen, daß die gleichen Verbindungen, die eine Aktivierung der Peroxydase zur Folge hatten, die Katalase hemmten. Die ersten Versuche führten wir mit Enzympräparaten aus Bohnenblättern durch, später benutzten wir kristallisierte Katalase aus Leber (Feinchemie Berlin-Schöneberg). Die Wirkungen waren, von ganz geringen Unterschieden abgesehen, gleich.

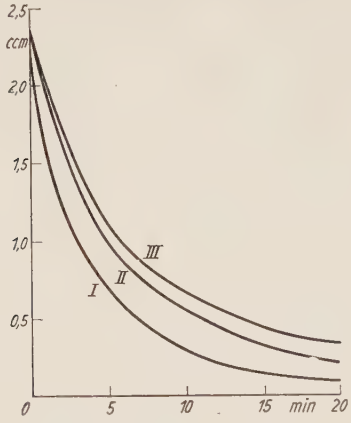


Abb. 11. Katalase, allein und mit Zusätzen.
I ohne Zusatz
II mit Chlorogensäure ($5 \cdot 10^{-6}$ Mol)
III mit Kaffeesäure ($5 \cdot 10^{-6}$ Mol)

Jeder Ansatz bestand aus: 20 ml n/10 Wasserstoffperoxyd (ohne Stabilisator) = 0,034 g H_2O_2 = $5 \cdot 10^{-3}$ Äquivalente und 0,1 ml Katalaselösung = 0,008 mg kristallines Enzym. Die Bestimmung führten wir wie beschrieben durch. Den Verlauf gibt Kurve I der Abbildung 11 wieder. Die Geschwindigkeitskonstante k bei der Zeit 10′ errechneten wir nach v. EULER und JOSEPHSON (1927) zu 0,089, woraus eine Katalase-Aktivität (Kat. f) von 11 220 folgt.

Als Zusätze prüften wir $5 \cdot 10^{-6}$ Mol Chlorogen- bzw. Kaffeesäure, das sind 1,8 mg Chlorogen- bzw. 0,9 mg Kaffeesäure pro Ansatz.

Den Verlauf der beiden Versuche geben die Kurven II (Chlorogensäure) und III (Kaffeesäure) wieder. Die Hemmung der Katalase ist beträchtlich und kommt besonders in den beiden Werten von 7842 (Chlorogensäure) und 6877 (Kaffeesäure) für Kat. f zum Ausdruck.

Eine Verschiebung des pH-Wertes konnte nicht festgestellt werden. Die gleichen Stoffe, die zu einer beträchtlichen Aktivierung der Peroxydase führten, hemmten also die Katalase.

4. Diskussion der Versuchsergebnisse

a) Verteilung in der gesunden und in der kranken Pflanze

In den gesunden Früchten war außer dem Quercetinglykosid keine Verbindung dieses Typs nachgewiesen worden. Wahrscheinlich sind die als Vorstufen notwendigen Zimtsäurederivate in kleinen Mengen vorhanden, werden jedoch nicht erfaßt. In den infizierten Früchten treten außer dem Quercetinglykosid noch p-Cumarsäure, Kaffeesäure und Ester dieser Säuren auf. Die Anreicherung einiger dieser Substanzen hatte schon Uritani (1953—55) in schwarzfaulen Süßkartoffeln festgestellt und gefolgert, daß die Synthese dieser Verbindungen gesteigert sein müsse. Auch Geissman (1956) hatte in viruskranken Kirschen- und Pfirsichblättern größere Mengen dieser Verbindungen nachgewiesen. Da die kranken Früchte weniger Zucker enthalten, wäre es möglich, daß ein Teil des Zuckers zur Synthese dieser Zimtsäurederivate verbraucht worden ist. Der geringere Gehalt kranker Früchte an Quercetinglykosid könnte durch einen Mangel an Phloroglucin hervorgerufen sein, das mit der Kaffeesäure zur Quercetinsynthese zusammentreten muß. Phloroglucin wird im Verlaufe des Zuckerstoffwechsels gebildet. Durch den geringen Zuckergehalt kranker Früchte wird die Synthese wahrscheinlich sehr verlangsamt. Außerdem wäre es möglich, daß die Glykosidsynthese aus Mangel an Glykon gehemmt ist. Dadurch käme es zu einer Anreicherung der Vorstufen wie Kaffee- und Chlorogensäure.

Die gesunden und kranken Blätter unterscheiden sich nicht so stark voneinander. Hier bestehen bezüglich des Flavonols, der Kaffee- und Cumarsäure sowie deren Chinasäureester nur quantitative Differenzen. Lediglich die kondensierte Substanz 6 und p-Cumarsäuremethylester treten neu auf. Dieser Stoff 6 ist charakteristisch für die kranken Pflanzen. Auch der p-Cumarsäuremethylester konnte bisher nur in erkrankten Organen gefunden werden, er stellt ein Analogon zum Kaffeesäuremethylester dar, der von Uritani (1953—55) in infizierten Süßkartoffeln als Begleiter der Kaffee- und Chlorogensäure festgestellt wurde. Alle Zimtsäurederivate, aber auch das Quercetinglykosid, sind in kranken Blättern, soweit sich das auf Papierchromatogrammen abschätzen läßt, stärker vertreten, nur die Chlorogensäure tritt in annähernd gleichen Konzentrationen auf, jedoch können erst quantitative Untersuchungen hierüber genaue Auskunft geben. Der analytisch ermittelte höhere Anteil an Quercetinglykosid geht auch bei den Blättern mit dem Zuckerspiegel konform, kranke Blätter enthalten mehr Zucker und Quercetin. Die größere Menge an Kaffeesäure, Cumarsäure und ihren Derivaten dürfte ähnliche Ursachen haben wie bei den Früchten. Daß die Unterschiede nicht so groß wie bei diesen sind, liegt zum Teil sicherlich daran, daß die Blätter weniger stark vom Pilz befallen sind. Außerdem enthalten auch schon gesunde Blätter Cumarsäure, Kaffeesäure und deren Chinasäureester. Das Vorkommen von Brenzkatechinderivaten in Bohnen haben schon Palladin und Tolstaja (1913) angenommen und ihnen eine Rolle als Atmungschromogene zugeschrieben. Nach ihren Ergebnissen muß es sich

hierbei um Chlorogen- oder Kaffeesäure handeln, da sie nach peroxydatischer Oxydation ein rotes, später braun werdendes Pigment erhielten.

Die Untersuchungen über den Ligningehalt gesunder und kranker Stengel hatten ergeben, daß in kranken Stengeln weniger Lignin als in gesunden enthalten ist. Lignin und Quercetin haben gleiche Vorstufen, nämlich die Phenylpropanderivate. Da wir in Blättern und Früchten der kranken Pflanze diese Vorstufen reichlich, ja sogar mehr als in gesunden Organen fanden, kann der geringere Gehalt an Lignin nicht auf Mangel an Ligninvorstufen zurückgeführt werden, wenn nicht in den Stengeln andere Verhältnisse herrschen sollen. Da sich auf den Stengeln jedoch starke Schadstellen des Parasiten befinden, wäre es möglich, daß die Phenolcarbonsäuren zur Melaninbildung herangezogen werden und deshalb für die Ligninsynthese in geringerer Menge zur Verfügung stehen. Die Melaninsynthese, eine Reaktion der Wirtspflanze, würde also auf Kosten der Ligninsynthese ablaufen.

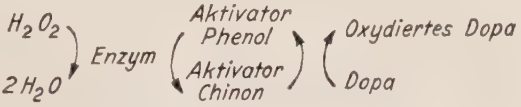
b) Die Melaninbildung

Die Ursache der Melaninbildung von Pflanzen ist noch unbekannt. Während es bei Tieren sicher zu sein scheint, daß sie vom Tyrosin ausgeht, kommen bei Pflanzen zweifellos noch andere Inhaltsstoffe mit Phenolcharakter in Frage. Die durch pilzliche Infektion hervorgerufene Melaninbildung an Bohnen kann, wie gezeigt wurde, nicht vom Tyrosin oder dem unmittelbaren Folgeprodukt, Dopa, ihren Ausgang nehmen. Als Substrate für die Oxydasen kommen in den Bohnen p-Cumarsäure, Kaffeesäure und deren Derivate in Frage. Von welchem dieser Stoffe der Prozeß tatsächlich seinen Ausgang nimmt, konnte nicht festgestellt werden. Besonders leicht ließen sich Chlorogen- und Kaffeesäure enzymatisch oxydieren. Auch andere Bearbeiter ziehen Stoffe dieser Art als Ausgangssubstanzen für die Melanogenese in Erwägung, so INGRAHAM und CORSE (1951) die Chlorogensäure, SHIROYA, SHIROYA und HATTORI (1955) Kaffee- und Chlorogensäure. Auch WAGGONER und DIMOND (1956) konnten mit Enzymlösungen aus Tomaten Tyrosin nicht oxydieren. Sie folgern aus der leichten Oxydierbarkeit der Chlorogensäure und anderer o-Diphenole, daß diese für die Verfärbungen der Pflanzen verantwortlich sein müßten. Pathologisch auftretende Stoffe sollen danach immer die primären Substrate von Oxydasen sein und damit die Ursache der Melaninbildung. Die in kranken Früchten auftretenden Phenolderivate Kaffee- und Chlorogensäure ließen sich in vitro mit Enzympräparaten leicht oxydieren, über rote und braune Zwischenstufen entstanden fast schwarze, unlösliche Produkte. Ob diese Reaktion auch in vivo so verläuft, ist jedoch nicht bewiesen. Eine Stütze für diese Hypothese bedeutet die hohe Oxydaseaktivität kranker Gewebe.

c) Die sekundären Stoffe als Effektoren der Enzymwirkung

Durch die Versuche über die Aktivierung der Peroxydase war festgestellt worden, daß bestimmte Phenole und Phenolcarbonsäuren die fermentative Oxydation des Dopa mehr beschleunigen als andere. Hierbei war es

gleichgültig, ob das Enzympräparat aus Bohnenblättern oder Meerrettich hergestellt worden war. Wichtig für die Oxydationsgeschwindigkeit war lediglich die Konstitution des als Aktivator benutzten Phenols. Folgende Veränderungen am Molekül steigerten seine Wirkung besonders: Erhöhung der Zahl der Hydroxylgruppen (z. B. Zimtsäure — Monooxyzimtsäure — Dioxyzimtsäure), Einführung der Acrylsäureseitenkette (z. B. Protokatechusäure — Kaffeesäure) und Abdeckung der Carboxylgruppe (Kaffeesäure — Chlorogensäure). Bei Abdeckung der Carboxylgruppe durch Veresterung war die Wirkung der Substanz um so größer, je kleiner das Molekulargewicht der dazu verwendeten alkoholischen Komponente war (z. B. Chinyl > Äthyl > Methylester der Kaffeesäure). Alle aktivierenden Substanzen enthalten eine oder zwei phenolische Hydroxyle als „aktive" Gruppen. Sie sind deshalb Substrate der Peroxydase, deren Wirkungskreis hier dem der Phenoloxydase entspricht. Auch die Aktivatoren werden also vom Enzym oxydiert. Die erste Reaktion sollte, wie bei allen Diphenolen, die Bildung des Chinons sein. Dieses Aktivator-Chinon wird mit dem Substrat-Phenol (Dopa) reagieren, und zwar in der Form, daß das Substrat dehydriert wird. Der Wasserstoff geht auf das Chinon über und reduziert dieses zum Diphenol. Es würde dann folgendes Reaktionsschema bestehen:



Der Wasserstoff des Substrates wird so über das als Zwischenkatalysator (Reinemund und Flaig 1955) dienende Diphenol-Chinon-System auf das Wasserstoffperoxyd übertragen. Für einen so wirkenden Stoff hat Michaelis (1951) den Ausdruck „enzymatisches Komplement" geprägt, und ihn wie folgt definiert: „Ein enzymatisches Komplement ist ein Substrat einer Oxydoreduktase, das während der Stoffwechselvorgänge dauernd reversiblen Veränderungen unterliegt und unter physiologischen Bedingungen nur in kleinen Mengen vorhanden ist". Diese Definition des Begriffes „Effektor" (Bersin 1951) stimmt mit der von uns beschriebenen Wirkung der Phenole und Phenolcarbonsäuren überein. Nach Hoffmann-Ostenhof (1954) sollten jedoch die Wirkungen der Effektoren von denen der Komplemente getrennt werden, da erstere nicht unbedingt für den Ablauf einer enzymatischen Reaktion erforderlich sind. Zweifellos ist die genaue Abgrenzung beider Begriffe schwierig.

Außer dieser Erklärung sind auch noch andere Mechanismen der Aktivierung vorstellbar. Einmal kann der Aktivator Veränderungen am Enzymmolekül selbst vornehmen, besonders an der prosthetischen Gruppe, dem Protohämin IX. Hierüber die Entscheidung zu treffen ist jedoch sehr schwer. Ein eindeutiges Beispiel für eine derartige „Enzymaktivierung" ist auch noch nicht bekannt (Hoffmann-Ostenhof 1954). Schließlich könnte noch eine Reaktion mit dem Substrat stattfinden (Substrataktivierung), wobei das Reaktionsprodukt schneller angreifbar sein müßte. Auch über diese Möglichkeit

sind bisher auf dem Gebiete der enzymatischen Komplemente wenige Beispiele bekannt geworden. — Neben der beschriebenen Oxydation über den Aktivator findet noch eine direkte Reaktion zwischen Enzym und Substrat statt, die jedoch nur zu einer vergleichsweise geringen Oxydation von Dopa führt.

Welches die tiefere Ursache der unterschiedlich starken Wirkung der Aktivatoren ist, können wir noch nicht entscheiden. Zweifellos sind die phenolischen Hydroxyle als „aktive", d. h. an der Reaktion teilnehmende Gruppen unentbehrlich. Als „aktivierende" Gruppen wirken im Effektormolekül die Carboxylgruppe und besonders die Acrylsäure-Seitenkette, wobei, wie wir sahen, deren Wirkung bei Veresterung zunimmt. Wahrscheinlich ist das Redoxpotential des Aktivators von entscheidendem Einfluß. Leider standen Angaben über die Potentiale der hier verwendeten Stoffe nur zum allerkleinsten Teil zur Verfügung, so daß eine Einordnung unmöglich war. Andererseits ist es jedoch auch denkbar, daß sich ein Enzym-Aktivator-Komplex je nach Konstitution des Aktivators verschieden schnell bildet. Unter diesen Umständen könnte die Bildung des Enzym-Chlorogensäure-Komplexes schwieriger sein als die des Komplexes Enzym-Kaffeesäuremethylester, was die stärkere Aktivierung durch die letzte Substanz erklären würde.

Allerdings bleibt hier die Frage offen, warum die Kaffeesäure selbst bedeutend schwächer wirkt als ihre Ester und warum z. B. Brenzkatechin und Protokatechusäure so wenig aktivieren, was diese Erklärung unwahrscheinlich macht. Die geringere Wirkung der Monophenole dürfte leichter zu deuten sein, hier ist es zunächst nötig, eine zweite Hydroxylgruppe einzuführen, bevor die Dehydrierung zum o-Chinon erfolgen kann. — Die Ergebnisse werden sicher nicht nur durch einen angeführten Mechanismus erklärt, sondern kommen durch das Zusammenspiel mehrerer möglicher Prozesse zustande.

Nach der Definition von MICHAELIS (1951) stellen die Aktivatoren die „primären" Substrate der Peroxydase dar. Die sich daraus ergebenden Folgerungen scheinen uns nicht nur für dieses relativ kleine Gebiet der Aktivierung wichtig. Da, wie gezeigt werden konnte, die Ester die Oxydation des Dopa stets stärker förderten als die freien Säuren, müssen diese Ester definitionsgemäß auch selbst schneller oxydiert werden. Insbesondere scheint uns das für die p-Cumarsäure und ihren Methylester wichtig zu sein, da hier beim Ester der Eintritt der zweiten Hydroxylgruppe leichter vor sich gehen muß. Zu gleichen Ergebnissen in ganz anderem Zusammenhang kamen auch URITANI und Mitarbeiter (1953—55) bei der Kaffeesäure und ihren Estern. Sie fanden, daß der Methylester schneller oxydiert wird als die Chlorogensäure und diese schneller als die Kaffeesäure selbst, was unseren eigenen Befunden bezüglich der Reihenfolge entspricht. Ebenso wurde Tyrosinäthylester schneller oxydiert als das Tyrosin selbst.

Die Feststellung, daß die Einführung der zweiten Hydroxylgruppe bei den Estern leichter ist als bei den freien Säuren, scheint uns für die Biogenese charakteristischer sekundärer Pflanzenstoffe, wie Chlorogen- und Kaffeesäure, wichtig zu sein. Bis vor kurzem war der einzige Ester im Bildungsgang

der Phenylpropanabkömmlinge die Chlorogensäure gewesen (Abb. 12) (Reznik 1956). Vor wenigen Jahren haben Cartwright, Roberts, Flood und Williams (1955) über das Vorkommen eines zweiten Esters (des p-Cumarsäure-Chinasäure-Esters) in Tee, Äpfeln und Birnen berichtet und gezeigt, daß dieser Ester weit verbreitet ist. Inzwischen hatten Schütte, Langenbeck und Böhme (1957) den Ester in Blüten von *Anthirrhinum majus* nachweisen können, während er von uns in Bohnenblättern festgestellt wurde. Nach diesem Vorkommen in Blättern, Früchten und Blüten scheint es sich um einen weit verbreiteten Stoff zu handeln, der nach unseren Feststellungen häufig mit der Chlorogensäure zusammen auftritt. Diese Tatsache und die nahe Verwandtschaft zur Chlorogensäure legen es nahe, den p-Cumarsäurechinylester für eine Vorstufe der Chlorogensäure zu halten.

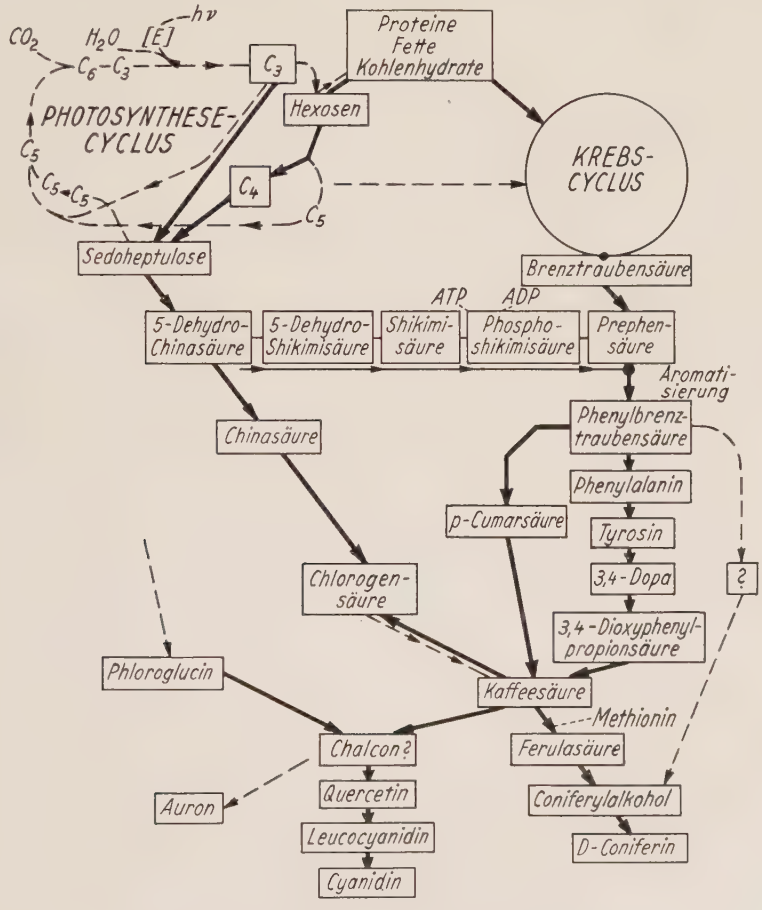


Abb. 12. Biogeneseschema nach Reznik (1956)

Bei dem Schema der Biogenese fällt besonders auf, daß die Chlorogensäure neben ihrer „Depotfunktion" (Ruckenbrod 1955) für die Kaffeesäure überhaupt kein Intermediärprodukt des Biogeneseprozesses darstellt, sondern

erst aus der Kaffeesäure entstehen soll. Bei der allgemeinen Verbreitung, die ein Maß für die Wichtigkeit im Stoffwechsel sein sollte, ist dies zumindest unwahrscheinlich. Die Entstehung der Kaffeesäure über Tyrosin und Folgeprodukte scheint in manchen Pflanzen und deren Organen zweifelhaft. Kürzlich (RUCKENBROD 1955) wurde durch Fütterungsversuche bewiesen, daß Tyrosin in Kaffee- und Efeublättern nicht in Kaffee- und Chlorogensäure weiter verarbeitet wird. Die Einordnung des p-Cumarsäurechinylesters in den Prozeß bereitet keine Schwierigkeiten; der Ester muß durch Reaktion der Cumarsäure mit der Chinasäure entstehen. Da in allen angeführten Beispielen die Ester stets leichter oxydiert wurden als die freien Säuren, sollte die zweite Hydroxylgruppe leichter in den Cumarester als in die freie Säure einzuführen sein. Die hieraus entstandene Chlorogensäure und nach Abspaltung der Chinasäure auch die Kaffeesäure würden somit folgerichtig aus ihrer Vorstufe, der p-Cumarsäure, gebildet. Die Chinasäure würde in diesem abgeänderten Schema (Abb. 13) eine Art Kreisprozeß durchlaufen. Als Vorstufe der p-Cumarsäure soll die Phenylbrenztraubensäure (Abb. 12) fungieren. Wir glauben, daß hier noch mindestens eine, vielleicht auch zwei Zwischenstufen einzuordnen sind, ohne hierfür zur Zeit schon Beweise anführen zu können (REZNIK 1956). Dieser (zweite) Synthese-Weg über die Ester steht in einer gewissen Konkurrenz zu dem anderen Weg über die Amino-

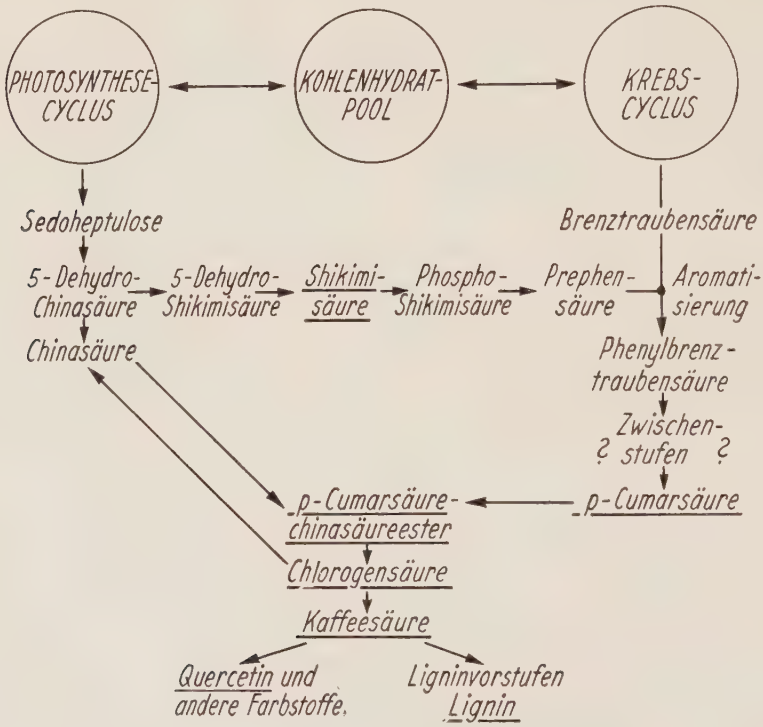


Abb. 13. Möglicher Verlauf der Biogenese der sekundären Pflanzenstoffe, festgestellte Stoffe unterstrichen

säuren Phenylalanin, Tyrosin, Dopa und die Hydrokaffeesäure. Welchen Weg die Pflanze tatsächlich verfolgt oder welcher bevorzugt verwendet wird, kann jetzt noch nicht entschieden werden.

Kaffeesäure und p-Cumarsäure sind keine Endprodukte auf dem Biosyntheseweg, sondern — allerdings sehr wichtige — Zwischenstoffe. Besonders Kaffeesäure und ihre Abkömmlinge sind Vorstufen bei der Biosynthese des Quercetins (Birch, Donovan und Moewus 1953); beide Stoffe weisen zwei Hydroxylgruppen im Ring B auf. In diesem Zusammenhang ist eine Arbeit von Kathen (1957) erwähnenswert, der Chlorogensäure und Quercetingalaktosid in Äpfeln (Sorte Ontario) nachwies. Demgegenüber kommt der p-Cumarsäure und ihren Derivaten Bedeutung als Vorstufe der Flavonoide Apigenin, Kaempferol und Pelargonidin (Geissmann und Harborne 1955, Reznik und Urban 1957, Schütte, Langenbeck und Böhme 1957) zu. In diesem Falle würde dann keine zweite Hydroxylgruppe in die Cumarsäure bzw. ihren Chinasäureester eingeführt werden.

Wie gezeigt wurde, hatten die gleichen Substanzen, die die Oxydation von Dopa durch ein Peroxydase-Präparat förderten, eine Hemmung der Katalase zur Folge. Wir verwendeten Chlorogen- und Kaffeesäure in Mengen von 0,1 %, bezogen auf das Substrat Wasserstoffperoxyd.

Vor kurzem hat Lück (1957 a, 1957 b) die Ergebnisse von Versuchen mitgeteilt, bei denen einfache organische Säuren die Katalase in unterschiedlichem Maße hemmten. Die Hemmung war bei einem gegebenen pH-Wert von der Dissoziationskonstanten der Säure und ihrer Konstitution abhängig. Die erzielten Hemmungen sind hier teilweise bedeutend größer, allerdings wurden auch größere Mengen an Hemmstoffen verwendet. Einen neuen Gesichtspunkt können die Arbeiten von Tauber (1955, 1956) in die Beurteilung der Hemmung der Katalase bringen. Tauber konnte zeigen, daß kristalline Katalase — wie Peroxydase — die bekannten Substrate oxydieren kann. Die Katalase dehydriert also nicht nur Wasserstoffperoxyd, sondern auch, in Gegenwart kleiner Mengen an Peroxyd, bevorzugt Phenole. Im sauren Bereich (z. B. pH 5,3) ist die Katalasefunktion begünstigt, während in der Nähe des Neutralpunktes auch die Peroxydasewirkung zur Geltung kommt. Es ist deshalb möglich, daß es sich bei der beobachteten Hemmung um eine Konkurrenzreaktion um den Platz am Enzym bzw. dessen prosthetischer Gruppe handelt, jedoch können erst weitere Versuche hierüber Auskunft geben.

Ich möchte meiner Laborantin, Frl. H. Gühne, Frl. H. Nordmann für Fotoarbeiten und Herrn A. Sahlmann für die Zeichnung der graphischen Darstellungen meinen Dank aussprechen.

Zusammenfassung

1. Gesunde Blätter enthielten folgende sekundäre Pflanzenstoffe: Quercetingalaktosid, Chlorogensäure, p-Cumarsäure-Chinasäureester, Kaffeesäure und p-Cumarsäure, kranke Blätter außerdem noch p-Cumarsäuremethylester

und eine kondensierte Substanz, wahrscheinlich eine Melaninvorstufe. In gesunden Früchten konnte nur das Quercetinglykosid festgestellt werden, infizierte Früchte enthielten darüber hinaus noch Chlorogensäure, p-Cumarsäure-Chinasäureester, Kaffeesäure, p-Cumarsäure, p-Cumarsäuremethylester und den kondensierten Stoff. Kranke Blätter enthielten mehr Quercetinglykosid als gesunde, kranke Früchte weniger. In kranken Stengeln wurde weniger Lignin als in gesunden festgestellt.

2. Die Melaninbildung geht nicht von Tyrosin/Dopa aus. Tyrosin konnte enzymatisch nicht oxydiert werden.

3. Bestimmte Inhaltsstoffe der Pflanze wirken als Effektoren der Enzymwirkung. Außer anderen Substanzen förderten Kaffeesäure und deren Methyl-, Äthyl- und Chinylester, p-Cumarsäure und sein Methylester sowie Ferulasäure die peroxydatische Oxydation von Dopa in spezifischer Weise, wobei es gleichgültig war, ob das Enzympräparat aus Bohnenblättern oder Meerrettich gewonnen war. Kaffee- und Chlorogensäure, die die Peroxydase aktiviert hatten, hemmten die katalatische Funktion, wobei sich Enzympräparate aus Bohnenblättern und kristallisierte Katalase entsprechend verhielten.

4. An Hand der analytischen Befunde und im Zusammenhang mit den Versuchen über die Aktivierung der Peroxydase wird ein möglicher Biosyntheseweg der sekundären Pflanzenstoffe in Bohnen diskutiert.

Summary

1. Healthy leaves contained the following secondary plant products: quercetin galactoside, chlorogenic acid, p-coumaric-quininic ester, caffeic acid and p-coumaric acid; diseased leaves also contained p-coumaric methyl ester and a condensed substance, probably a precursor of melanin. In healthy fruits only quercetin glycoside could be detected; diseased fruits contained also chlorogenic acid, p-coumaric-quininic ester, caffeic acid, p-coumaric acid, p-coumaric methyl ester, and the condensed substance. Diseased leaves contained more quercetin glycoside than healthy leaves, whereas diseased fruits contained less. In diseased stems less lignin was found than in healthy stems.

2. Melanin formation does not start from tyrosin/dopa. Tyrosin could not be oxidized enzymatically.

3. Certain substances contained in the plant act as activators of enzyme action. In addition to other substances the following stimulated the oxidation of dopa by peroxidase in a particular manner, the same effect being produced whether the enzymes were prepared from bean leaves or from horseradish: caffeic acid and its methyl, ethyl and quinyl esters, p-coumaric acid and its methyl ester, and also ferulic acid. Caffeic and chlorogenic acids, which had activated the peroxidase, inhibited its catalytic effect, enzyme preparations from bean leaves and crystallized catalase showing characteristic reactions.

4. On the basis of the results of analysis and of experiments on the activation of peroxidase a possible mode of biosynthesis of the secondary plant products in beans is discussed.

Literaturverzeichnis

Bate-Smith, E. C., and A. G. Washall, 1950: Chromatographic behaviour and chemical structure. I. Some naturally occuring phenolic substances. Biochim. biophys. acta **4**, 427—432.

Bayer, E., 1957: Aromastoffe des Weines. Die Carbonsäureester des Weines und der Trauben. Vitis **1**, 34—41.

Bersin, Th., 1951: Kurzes Lehrbuch der Enzymologie. Akad. Verlagsges. Leipzig.

Birch, A. J., F. W. Donovan and F. Moewus, 1953: Biogenesis of flavonoids in *Chlamydomonas eugametos*. Nature **172**, 902—904.

Cartwright, R. A., E. A. H. Roberts, A. E. Flood and A. H. Williams, 1955: The suspected presence of p-coumaryl-quinic acids in tea, apple and pear. Chem. and ind., 1062—1063.

v. Euler, H., und K. Josephson, 1927: Über Katalase I. Liebigs Ann. Chem. **452**, 158—181.

Freudenberg, K., 1955: Lignin. In Paech, K., und M. V. Tracey, Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, III, 499—516, Springer, Berlin—Göttingen—Heidelberg.

Geissman, T. A., 1956: The flavonoid constituents of normal and virusinfected peach and cherry leaves. Arch. biochem. Biophys. **60**, 21—26.

— —, and J. B. Harborne, 1955: The chemistry of flower pigmentation in *Antirrhinum majus*. IV. The albino (-mm-nn) form. Arch. biochem. biophys. **60**, 21—26.

Guggenheim, M., 1923: Dioxyphenylalanin, eine neue Aminosäure in *Vicia faba*. Z. physiol. Chem. **88**, 276—284.

Helferich, B., und F. Vorsatz, 1935: Notiz über die Ester der Kaffeesäure. J. prakt. Chem. **142**, 191—192.

Herrmann, K., 1954: Die o-Polyphenoloxydase und ihre Wirkungen. Pharmazie **9**, 670 bis 681.

— —, 1955 a: Über den Nachweis und die Untersuchung ein- und mehrwertiger Phenole auf dem Papierchromatogramm. Pharm. Z. Halle **95**, 56—61.

— —, 1955 b: Über die Flavonole der Blätter von *Juglans regia* L. Arch. Pharm. **288**, 362—365.

Herzmann, H., 1957: Über die Aktivierung der Peroxydase. Naturwissenschaften **44**, 377.

— —, 1958: Biochemische Untersuchungen über den Stoffwechsel gesunder und brennfleckenkranker Bohnen. I. Untersuchungen über Kohlenhydrate, Stickstoffverbindungen, Carbonsäuren und einige Oxydationsenzyme. Phytopath. Z. **33**, 349—370.

Hoffmann-Ostenhof, O., 1954: Enzymologie. Springer, Wien.

Ingraham, L. L., and J. Corse, 1951: Enzymatic browning of fruits. J. Amer. chem. soc. **73**, 5550—5553.

Kathen, H., 1957: Quercetingalaktosid und Chlorogensäure in Ontarioäpfeln. Z. Lebensmitteluntersuchung **105**, 22—24.

Lerner, A. B., 1953: Metabolism of phenylalanin and tyrosine. Adv. enzymology **14**, 73—128.

Lück, H., 1957 a: Katalasehemmung durch organische Säuren. Biochem. Z. **328**, 411—419.

— —, 1957 b: Zur pH-Abhängigkeit der Katalase-Aktivität. Naturwissenschaften **44**, 423.

Matthias, W., 1954: Serienuntersuchungen mit Hilfe einer neuen Form der Streifenpapierchromatographie. Naturwissenschaften **41**, 17.

Michaelis, L., 1951: Theory of oxidation-reduction. In Sumner, J. B., and K. Myrbäck, The enzymes, Bd. II/1, S. 1—54. Acad. press. New York.

Palladin, W., und Z. Tolstaja, 1913: Sauerstoffabsorption durch Atmungschromogene der Pflanzen. Biochem. Z. **49**, 381.

*Paris, R., 1952: Bull. soc. chim. biol. **34**, 767.

*Partridge, S. M., 1948: Biochem. J. **42**, 238.

Posner, Th., 1910: Notizen zur Darstellung substituierter Zimtsäuren. J. prakt. Chem. **82**, 425—440.

Raper, H. S., 1926: The tyrosinase-tyrosine reaction. J. biol. chem. **20**, 735—742.

— —, 1927: The tyrosinase-tyrosine reaction. Biochem. J. **21**, 89—96.

Reinemund, K., und W. Flaig, 1955: Zur Kenntnis der Huminsäuren. Z. Pflzernährg. Düngung, Bodenk. **68**, 269.

Reznik, H., 1956: Untersuchungen über die physiologische Bedeutung der chymochromen Farbstoffe. Sitzungsber. Heidelb. Akad. Wiss., math.-naturwiss. Kl., 2. Abhandlung 125—217.

— —, und R. Urban, 1957: Über den Metabolismus ^{14}C markierter Ferulasäure im Pflanzenversuch. Naturwissenschaften **44**, **13**.

Ruckenbrod, H., 1955: Über den Umsatz der Chlorogensäure in höheren Pflanzen. Planta **46**, 19—45.

Schütte, H., W. Langenbeck und H. Böhme, 1957: Genetisch-biochemische Untersuchungen über Blütenfarbstoffe an Mutanten von *Antirrhinum majus*. — Chinasäure als p-Cumarsäureester in *Antirrhinum majus*. Naturwissenschaften **44**, 63.

Shiroya, M., T. Shiroya and S. Hattori, 1955: Studies on the browning and blackening of plant tissues. Physiol. plant. (Copenh.) **8**, 594—605.

Tauber, H., 1955: Oxidation of pyrogallol to purpurogallin by cristalline catalase. J. biol. chem. **205**, 395—400.

— —, 1956: Christalline catalase, a peroxidase. Proc. soc. exper. biol. med. **81**, 237—239.

Uritani, I., und Mitarbeiter, 1953—1955: Phytopathologische Chemie der schwarzfaulen Süßkartoffeln. J. agric. soc. Japan **27**, 688—692, **28**, 205—212 und **29**, 151—156, 156—161 und 344—349.

Waggoner, A. I., and A. E. Dimond, 1956: Polyphenol oxidases and substrates in potato and tomato stems. Phytopathology **46**, 495—497.

Williams, A. H., 1955: Paper chromatography of cinnamic acid derivates. Chem. and ind. 120—121.

* Die Arbeiten waren nur im Referat zugänglich.

Aus dem Institut für Pflanzenschutz
der Landwirtschaftlichen Hochschule Hohenheim
Direktor: Prof. Dr. Bernhard Rademacher

Einfluß der Quecksilber-Beizung auf Keimung und Jugendwachstum der Gerste unter besonderer Berücksichtigung ihrer selektiven Wirkung auf die samenbegleitende Mikroflora[1])

Von

G. Roth

Mit 7 Abbildungen

I. Einleitung und Problemstellung

Aus zahlreichen Veröffentlichungen geht hervor, daß unsere Kulturpflanzen zum Keimen und Wachsen durch bestimmte chemische Stoffe angeregt (stimuliert) werden können. Vielen günstigen Resultaten stehen auch ungünstige gegenüber. In der Mehrzahl der Fälle wurde der Beweis eines positiven Einflusses vor allem mit Quecksilberbeizmitteln erbracht, doch blieb die Frage nach den eigentlichen Ursachen einer „Stimulation" bis auf Arbeiten von Ruge (1947, 1948, 1952) unberührt. Die starken Wandlungen auf dem Gebiet der Saatgutbeizung gaben den Anstoß, die schon seit mehreren Jahrzehnten schwebende Frage der sogenannten „Stimulation" durch die Beizung zu prüfen. In diesem Zusammenhang sollte auch die Frage nach den günstigen Einflüssen der Quecksilberbeizmittel aufgegriffen und ein Beitrag über ihre Wirkung auf Keimung und Jugendwachstum von Gerste und auf die samenbegleitende Mikroflora geleistet werden.

Daß Spelzen und Oberfläche der Getreide-Karyopsen stark mit Mikroorganismen (Bakterien und Pilzen) infiziert sind, ist bekannt. Wie sich diese Mikroorganismen bei der Keimung und während des ersten Jugendwachstums auswirken und ob die stimulierende Wirkung der Beizmittel auf einer Ausschaltung oder Zurückdrängung gewisser Mikroorganismen beruht, wurde noch nicht näher untersucht. Deshalb sollte der Einfluß von Beizmitteln auf Lagerung, Entwertung der Samen, Keimfähigkeit sowie auf Artenzahl und Menge der vorkommenden Mikroorganismen festgestellt werden.

[1]) Auszug aus der gleichlautenden Dissertation der Landw. Hochschule Hohenheim 1958.

II. Experimenteller Teil

A. Untersuchungen über den Einfluss der Quecksilberbeizung auf Keimung und Jugendentwicklung von Gerste und deren samenbegleitende Mikroflora

Methoden[1])

1. Versuchsmaterial

Für die Hauptversuche wurde Hochzuchtsaatgut der Gerstensorte Haisa II von der Firma Ferdinand Heine aus Monsheim (Ernte 1954) bezogen und 1955 an acht verschiedenen Stellen Westdeutschlands angebaut (Dikopshof bei Bonn, Gießen, Göttingen, Stuttgart-Hohenheim, Kiel, Oberer Lindenhof bei Reutlingen, Monsheim bei Worms und Weihenstephan bei Freising), um die Zusammensetzung der Mikroflora auf der gleichen Sorte unter verschiedenen Umweltbedingungen sowie den Einfluß der Beizmittel auf Sorte und Herkunft zu studieren.

2. Beizmittel und Methodik

Für die Versuche wurden die Samen drei Tage vor Einsaat im Trockenbeizverfahren mit 0,2 %iger Dosis in einem Glaskolben zehn Minuten lang behandelt. Zur Anwendung kamen die anerkannten Hg-Beizmittel „Abavit-Neu Universal-Trockenbeize 25 852“ (Schering), „Ceresan Universal-Trokkenbeize U. T. 11 975a“ (Bayer-Leverkusen), „Germisan Universal-Trockenbeize 4099a“ (Fahlberg-List), „Dynamal 52 Universal-Trockenbeize“ (Chemische Werke Albert) und „Cerenox spezial“ (Bayer-Leverkusen).

3. Prüfung von Keimfähigkeit und Triebkraft

Keimfähigkeits- und Triebkraftprüfungen erfolgten nach der bei Eggebrecht (1949) beschriebenen Methode und gleichzeitig zur Sicherung nach der von Lakon (1942) angegebenen Tetrazoliummethode.

4. Sterilisation des Saatgutes

Um den Einfluß der Mikroorganismen auf die Entwicklung des Keimlings studieren zu können, wurde das Saatgut mit Hilfe einer Apparatur (Roth 1958) von seiner natürlichen, ihm anhaftenden Mikroflora befreit. Nach dieser Methode konnte eine absolute Oberflächensterilität mit nur geringer Beeinträchtigung der Keimfähigkeit erreicht werden.

5. Ermittlung des Mikroorganismenbesatzes

Es wurden Aufschwemmungen in steriler physiologischer Kochsalzlösung unter Zugabe von etwas „Rei“ durchgeführt. In einem 150 ccm großen Homokolben wurden 10 g Körner in 50 ccm Flüssigkeit neun Minuten lang bei etwa 5000 Umdrehungen und 30 Sekunden bei höchster Umdrehungszahl von etwa 50 000 homogenisiert. Dies geschah, um die an den Körnern haftenden Mikroorganismen abzulösen, die durch Bakterienschleim zusammenhängenden Mikroorganismen zu trennen und gleichmäßig in der Flüssigkeit zu verteilen.

[1]) Eine genaue Beschreibung der Methoden bzw. wichtige Hinweise auf diesbezügliche Literaturstellen können in der Originalarbeit Roth (1958) nachgelesen werden.

Mit weiteren 50 ccm wurde das an den Messern haftende Material nachgespült und der Aufschwemmung zugegeben. Von diesem Aufschwemmungsmaterial wurden Verdünnungsreihen angelegt, nach dem KOCH'schen Verfahren Platten gegossen, bei optimalen Wachstumstemperaturen bebrütet (Pilze 22 bis 25 °C, Bakterien 25 bis 30 °C) und nach 3, 10 und 18 Tagen ausgezählt.

Der Versuchsdurchführung nach der „Homogenisatormethode" ging eine Reihe von vergleichenden Versuchen voraus. Es wurden einige in der Literatur angegebene Aufschwemm-Methoden (DÜGGELI 1904, HOFFMANN 1896, MORGENTHALER 1918) miteinander verglichen. Die etwas höhere Mikroorganismenzahl nach der „Homogenisatormethode" ist darin begründet, daß durch die hohen Touren des rotierenden Messers die in dichten Haufen in den Vertiefungen der Samen liegenden Keime abgelöst und besser verteilt werden. Um grobe Fehler zu vermeiden, wurden verhältnismäßig große Mengen an Versuchsmaterial (2 × 10 g Samen) genommen. DÜGGELI (1904) arbeitete mit drei Samen je Art und Herkunft.

Ergebnisse

1. Einfluß der Beizung auf Keimfähigkeit und Triebkraft sowie die Verpilzung von Gerstensaatgut

In den eigenen Versuchen konnten die Angaben über eine stimulierende Wirkung der Hg-Beize auf die Keimung von Samen nicht bestätigt werden. Die Versuche zeigten vielmehr in Sand und Filtrierpapier eine beachtliche, in Ziegelgrus und Erde eine leichte Keimverzögerung. In allen Versuchen keimten die ungebeizten Samen schneller. Die durch Beizung hervorgerufene Keimverzögerung wurde jedoch schon nach einigen Tagen überwunden. Die Ergebnisse über die Keimschnelligkeit, die sehr stark von dem Feuchtigkeitsgehalt des Keimmediums abhängen (gebeizte Samen werden unter feuchten Keimbedingungen stark gehemmt), standen im Einklang mit denen von SCHÜTZ (1931).

Im weiteren Verlauf des Wachstums wurden die Keimverzögerungen in Ziegelgrus und in Erde schon nach 14 Tagen ausgeglichen, und eine wachstumsfördernde Wirkung der Hg-Beizung konnte beobachtet werden. Auf Filtrierpapier blieb die keimhemmende Wirkung meistens bis zum Abschluß der Versuche bestehen.

Bei den nun folgenden Versuchen über den Einfluß der Herkunft der gleichen Gerstensorte ergaben sich wesentliche Unterschiede im Tausendkorngewicht (Tab. 1), der anhaftenden Mikroorganismenzahl und geringere Unterschiede in der Keimfähigkeit und Triebkraft. Bei einer vergleichenden Betrachtung der einzelnen Herkünfte zeigten vor allem die mit erhöhtem Pilzbesatz behafteten Samen eine etwas geringere Keimfähigkeit. Samen mit einer längeren Keimverzögerung wurden schon nach zwei Tagen von einer Vielzahl von Mikroorganismen befallen, von Pilzen überwuchert und vernichtet. Die ungebeizten Samen zeigten eine beträchtlich höhere Verpilzung in allen Keimmedien als die gebeizten. Selbst bei der Triebkraftprüfung in Ziegelgrus ist ein solcher Unterschied in der Verpilzung deutlich zu erkennen. Die gebeizten Samen erbrachten bei der Ermittlung der Keimfähigkeitswerte

die Höchstzahl der überhaupt erreichbaren Keimprozente. Vergleichende Keimfähigkeits- und Triebkraftversuche eines durch Drusch leicht verletzten Saatgutes mit unverletztem zeigten, daß bei ungebeizten Samen mit Druschverletzungen der Anteil der Verpilzung am größten war. Dagegen hat die Hg-Beizung in allen Versuchen die Verpilzung auf ein Minimum zurückgedrängt. Nach Untersuchungen mit der von Maier (1950) ausgearbeiteten Methode sind für eine schnellere Verpilzung der Samen die feinen mechanischen Verletzungen an den Karyopsen und dem Embryo durch den Drusch und deren Auswirkungen auf den Samenembryo verantwortlich zu machen.

2. Einfluß der Beizung auf Zahl und Zusammensetzung der samenbegleitenden Mikroflora

Um den Mikroorganismenbesatz festzustellen, wurden die im vorigen Abschnitt auf ihre Keimfähigkeit und Triebkraft untersuchten acht Gerstenherkünfte der Sorte Haisa II, Ernte 1955, herangezogen. Als Nährböden zum Plattenguß wurden für die Erfassung der Bakterien $^1/_3$-Dextrose-Agar und Kartoffel-Dextrose-Agar, für Actinomyceten Conn-Agar und für Pilze Biomalzagar mit Karottensaftzusatz und Kartoffel-Dextrose-Agar mit niederem pH-Wert verwendet. Ausgewertet wurden Platten mit einer Kolonienzahl von 20 bis 400.

Die Bakterienkolonien wurden nach Farbe, Form und einer Reihe anderer Merkmale voneinander unterschieden. Die Actinomyceten sind bei der ersten und zweiten Auszählung nicht vollständig zu erfassen. Bei der dritten Auszählung am 18. Tage konnten die durch ihr Luftmyzel auffallenden Actinomyceten von den Bakterien leicht unterschieden werden. Die meisten der an Gerste vorkommenden Actinomyceten wiesen ein grauweißes bis weißes Luftmyzel auf, doch konnten auch Stämme mit grauem, braunem und gelbem Luftmyzel beobachtet werden. Das äußere Bild der Actinomycetenkolonien war mannigfaltig. Es konnten Stämme mit einem runzlig-faltigen, körnig-faltigen, warzig-faltigen, mehligen Luftmyzel in verschiedensten Variationen beobachtet werden.

In Tabelle 1 sind die Zahlen der gefundenen Mikroorganismen je g Körner aufgeführt. Gleich hier sei bemerkt, daß die hohen Mikroorganismenzahlen der Herkunft Gießen die anderen Herkünfte weit überragen. Dies ist nur verständlich, wenn man die Umstände berücksichtigt, unter welchen diese Herkunft geerntet und eine Zeitlang aufbewahrt wurde: Die Einsendung erfolgte ungedroschen in feuchtem Zustand, ein muffiger Geruch gab Zeugnis von einer regen Organismentätigkeit.

Die Zahl der an Gerstensamen haftenden Mikroorganismenkeime unterlag auch bei Samen gleicher Herkunft großen Schwankungen. Bei Einzelkornuntersuchungen ergaben sich solche von 3900 bis 2,6 Millionen Keimen (Herkunft Gießen). Verhältnismäßig niedere Werte ergaben die Einzelkornuntersuchungen der Herkunft Monsheim (480 bis 134 000).

Die Mittelwerte der Keimzahlen aus 2×10 g Saatgut sind von allen untersuchten Herkünften bei der Herkunft Gießen mit einem Besatz von 43 Millionen Bakterien, 1,6 Millionen Actinomyceten und 420 000 Pilzen am höchsten. Den geringsten Bakterienbesatz zeigte die Herkunft Monsheim mit

Tabelle 1

Anzahl der an Gerste Haisa II verschiedener Herkunft ermittelten Mikroorganismen je Gramm Körner[1])

Herkunft	Tausend-korn-gewicht	Bakterien		Actinomyceten		Pilze und Hefen	
		ungebeizt	gebeizt	ungebeizt	gebeizt	ungebeizt	gebeizt[2])
Keimgehalt acht Wochen nach der Ernte							
Dikopshof	42,9	$2{,}1 \times 10^7$	$6{,}2 \times 10^6$	$7{,}9 \times 10^4$	$5{,}3 \times 10^4$	$1{,}5 \times 10^5$	$8{,}7 \times 10^1$
Gießen	48,9	$4{,}3 \times 10^7$	$1{,}8 \times 10^7$	$1{,}6 \times 10^6$	$7{,}9 \times 10^5$	$4{,}2 \times 10^5$	$6{,}2 \times 10^1$
Göttingen	41,3	$5{,}8 \times 10^6$	$6{,}7 \times 10^5$	$1{,}3 \times 10^5$	$1{,}2 \times 10^5$	$3{,}5 \times 10^4$	$5{,}3 \times 10^1$
Hohenheim	45,5	$1{,}3 \times 10^7$	$4{,}8 \times 10^6$	$3{,}6 \times 10^4$	$2{,}9 \times 10^4$	$5{,}9 \times 10^4$	$5{,}8 \times 10^1$
Kiel	45,3	$1{,}7 \times 10^7$	$2{,}9 \times 10^6$	$4{,}2 \times 10^4$	$3{,}4 \times 10^4$	$8{,}9 \times 10^3$	$7{,}2 \times 10^1$
Lindenhof	46,2	$1{,}8 \times 10^7$	$5{,}1 \times 10^6$	$2{,}4 \times 10^5$	$1{,}3 \times 10^5$	$2{,}1 \times 10^5$	$1{,}4 \times 10^2$
Monsheim	45,6	$1{,}2 \times 10^6$	$9{,}4 \times 10^5$	$2{,}2 \times 10^5$	$1{,}9 \times 10^5$	$9{,}7 \times 10^4$	$2{,}4 \times 10^1$
Weihenstephan	36,7	$3{,}5 \times 10^6$	$4{,}2 \times 10^5$	$2{,}3 \times 10^5$	$1{,}9 \times 10^5$	$8{,}1 \times 10^4$	$8{,}4 \times 10^1$
Keimgehalt nach halbjähriger Lagerung							
Dikopshof	39,4	$1{,}5 \times 10^7$	$3{,}9 \times 10^6$	$6{,}2 \times 10^4$	$4{,}6 \times 10^4$	$5{,}6 \times 10^4$	$2{,}3 \times 10^1$
Gießen	42,9	$2{,}5 \times 10^7$	$6{,}7 \times 10^6$	$8{,}2 \times 10^5$	$3{,}7 \times 10^5$	$2{,}8 \times 10^5$	$3{,}1 \times 10^1$
Göttingen	38,8	$5{,}6 \times 10^6$	$3{,}8 \times 10^5$	$7{,}2 \times 10^4$	$2{,}7 \times 10^4$	$2{,}8 \times 10^4$	$2{,}6 \times 10^1$
Hohenheim	43,7	$9{,}4 \times 10^6$	$1{,}4 \times 10^4$	$3{,}2 \times 10^4$	$2{,}7 \times 10^4$	$3{,}5 \times 10^4$	$5{,}7 \times 10^1$
Kiel	42,4	$1{,}2 \times 10^7$	$2{,}4 \times 10^6$	$3{,}9 \times 10^4$	$3{,}5 \times 10^4$	$9{,}7 \times 10^3$	$2{,}1 \times 10^1$
Lindenhof	40,5	$1{,}6 \times 10^7$	$3{,}5 \times 10^6$	$1{,}7 \times 10^5$	$9{,}2 \times 10^4$	$8{,}5 \times 10^4$	$9{,}2 \times 10^1$
Monsheim	39,3	$1{,}1 \times 10^6$	$5{,}3 \times 10^5$	$1{,}9 \times 10^5$	$8{,}3 \times 10^4$	$7{,}3 \times 10^4$	$1{,}2 \times 10^1$
Weihenstephan	29,6	$3{,}3 \times 10^6$	$3{,}9 \times 10^5$	$2{,}2 \times 10^5$	$1{,}8 \times 10^5$	$3{,}2 \times 10^4$	$6{,}1 \times 10^1$

[1]) Mittelwerte aus 2 × 10 g Saatgut
[2]) Nur *Aspergillus* und *Penicillium*

1,2 Millionen, die niederste Actinomycetenzahl Herkunft Hohenheim mit 36 000 und den geringsten Pilzbesatz Herkunft Kiel mit 8900 Keimen je g Saatgut.

Die Keimzahlen aller Herkünfte gehen bei trockener Aufbewahrung im Laufe der Zeit stark zurück. Nach 6 Monaten weichen die Resultate von den unmittelbar nach der Ernte erzielten so stark ab, daß sie mit diesen nicht mehr in Einklang zu bringen sind. Viele Organismen scheinen bei trockener Lagerung zugrunde zu gehen. Eine Sonderstellung nehmen hier die Actinomyceten ein, ihre Zahl sinkt nur unwesentlich ab.

Ein Vergleich der Befunde zeigt, daß die Hg-Beizung auf die samenbegleitende Mikroflora sehr unterschiedlich wirken kann: Die ungebeizten Samen weisen an Bakterien und Actinomyceten meistens höhere Zahlen als die gebeizten auf; noch empfindlicher sind die Pilze mit Ausnahme der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium*. Bei den ermittelten Pilzzahlen der Tabelle 1 (Spalte „gebeizt") handelt es sich nur um diese beiden Pilzgattungen.

Nach halbjähriger Lagerung auf dem Speicher zeigt sich ein starkes Absinken der Mikroorganismen. Hier macht sich der Einfluß der Hg-Beizung

an Samen besonders stark bemerkbar. Die Bakterienzahl sinkt sehr stark ab, während die Zahl der Actinomyceten weniger davon betroffen wird. Die Pilzflora ist bis auf einige *Aspergillus*- und *Penicillium*-Arten völlig verschwunden.

3. Versuche über die Wirkung von Hg-Beizmitteln auf Gerstensamen geringerer Keimfähigkeit

Alle bisher beschriebenen Ergebnisse resultieren aus Versuchen mit einem Saatgut höchster Keimfähigkeit. Es schien daher angebracht, in einer weiteren Versuchsreihe auch den Einfluß der Hg-Beizung auf die Keimprozente eines in seiner Keimfähigkeit schon stark geschwächten Saatgutes zu studieren. Hierfür wurden Gerstenherkünfte (Ernte 1954) mit geschwächter Keimpotenz verwendet. Die Mehrzahl der Embryonen zeigte bei der Keimfähigkeitsprüfung nach dem Tetrazoliumtest im mikroskopischen Bild fortgeschrittene Embryonekrosen. Daß diese mit Nekrosen behafteten Samenembryonen empfindlicher gegenüber Mikroorganismeninfektionen waren, ging aus einer Reihe eigener Versuche hervor (Roth 1958). Die mit Ceresan behandelten Samen mit stark herabgesetzter Keimfähigkeit erbrachten bei der Ermittlung der Keimfähigkeitswerte nahezu oder ganz die Höchstzahl der überhaupt erreichbaren Keimprozente. Durch die Beizung wurde die samenzersetzende Tätigkeit der anhaftenden Mikroorganismen (vor allem der Pilze) ausgeschaltet. Die Körner zeigten ein gesundes Aussehen, im Gegensatz zu den ungebeizten, die einer starken Verpilzung anheimfielen (Abb. 1).

B. AUSWIRKUNG DER SAMENBEIZUNG AUF DIE ENTWICKLUNG DES KEIMLINGS

Die Wirkung der Hg-Beizung auf die samenzersetzenden Mikroorganismen ist nach vorliegenden Ergebnissen als eine durchaus günstige zu bezeichnen. Da in der Literatur vielfach den Beizmitteln eine keim- und wachstumsfördernde Wirkung zugeschrieben wird, soll nun die Frage einer Beizmittelwirkung auf Keimung und frühe Jugendentwicklung näher untersucht werden.

1. Der Einfluß der Hg-Beizung auf die Ausbildung der Wurzeln

Die zahlreichen Vergleichsversuche mit ungebeiztem und gebeiztem Gerstensaatgut brachten immer wieder Unterschiede in der Wurzelzahl. Es zeigte sich, daß selbst die einzelnen Hg-Beizmittel unterschiedlichen Einfluß auf die Wurzelbildung haben. Durch Ceresan, Abavit und Dynamal konnte ein Einfluß auf eine Wurzelvermehrung an Gerstenpflanzen erzielt werden. In der Regel haben Gerstenpflanzen im Keimlingsstadium sechs Wurzeln. Durch eine Behandlung der Samen mit Hg-Beizmitteln steigt die Wurzelzahl der Keimlinge auf sieben, in mehreren Fällen sogar auf acht und neun an. Die deutlichsten Unterschiede zeigten sich in Ziegelgrus (Roth 1958).

Die zur Auszählung der Wurzeln benutzten Jungpflanzen wurden sorgfältig im Wasser von Erde oder Ziegelgrus befreit. Hierbei konnte die interessante Feststellung gemacht werden, daß Wurzeln von gebeiztem Saatgut den Ziegelgrus stärker festhielten. Der Ziegelgrus haftet hier so fest, daß er

nur durch Reiben von den Wurzeln entfernt werden kann. Außerdem fällt hier der bessere Gesundheitszustand der behandelten Versuchsglieder auf. Dieses bessere Haftvermögen der gebeizten Versuchspflanzen läßt sich nur so deuten, daß durch die viel stärkeren Wurzelwindungen der Ziegelgrus straff umschlungen wird.

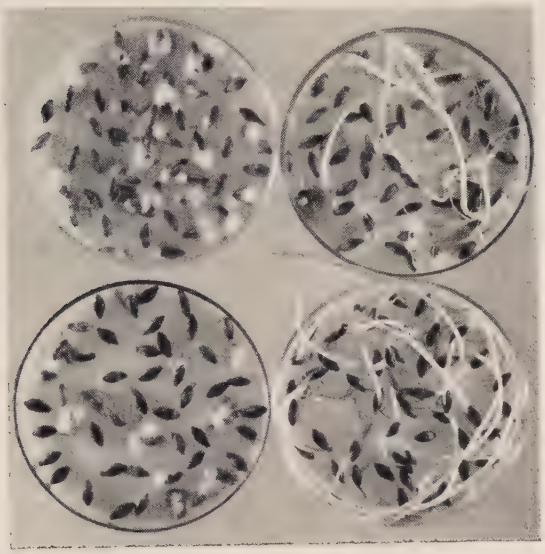


Abb. 1. Unbehandeltes und mit Ceresan gebeiztes Saatgut schlechter Keimfähigkeit bei der Keimprüfung auf Filtrierpapier in Petrischalen

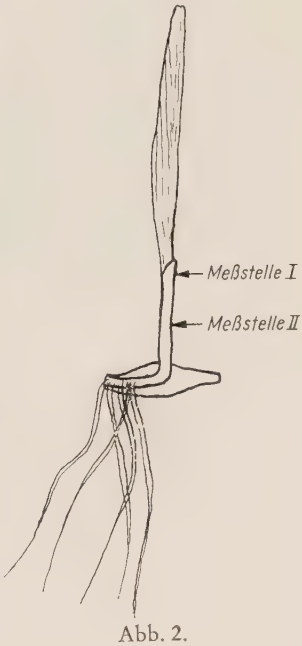


Abb. 2. Gerstenkeimling

2. Der Einfluß der Hg-Beizung auf die Größe der Keimpflanzen

Die mit Gerste durchgeführten Versuche zeigten in allen Keimmedien eine leichte Keimverzögerung durch Hg-Beizmittel. Hieraus ergibt sich in den ersten Tagen eine Wachstumshemmung, die im Verlauf der Entwicklung wieder ausgeglichen wird, und nicht selten tritt eine Umkehrung der Verhältnisse ein. Meist sind aber die Längenunterschiede der Keimlinge so uneinheitlich innerhalb der einzelnen Versuchsglieder, daß von einer Förderung oder Hemmung des Längenwachstums junger Gerstenpflanzen durch Beizung nicht gesprochen werden kann. In Erde sind die Längenunterschiede so gut wie aufgehoben. Auf Ausnahmen kann nicht weiter eingegangen werden. Die stärksten Keimverzögerungen sind in Filtrierpapier zu verzeichnen.

Viel interessanter sind die Ergebnisse über den Einfluß der Hg-Beizung auf Ausbildung und Wachstum des Koleoptilzylinders. Die hier festgehaltenen Ergebnisse lassen auf einen gewissen Reizeffekt der Hg-Beizmittel schließen. Zur Ermittlung von Unterschieden in der Größe wurde bewußt nicht von der Trockengewichtsbestimmung ausgegangen, sondern es wurde am 10. Tage die Dicke des Koleoptilzylinders mikroskopisch an zwei Stellen gemessen (Abb. 2, Tab. 2). Die Meßergebnisse wurden auf μ umgerechnet.

Tabelle 2

Durchmesser der Koleoptilzylinder
(Mittel- und Extremwerte aus jeweils 200 zehn Tage alten Gerstenpflanzen in μ. Mittelwerte = MW, Extremwerte = EW)

Keimmedium	Meßstelle I				Meßstelle II			
	ungebeizt		gebeizt		ungebeizt		gebeizt	
	EW	MW	EW	MW	EW	MW	EW	MW
Ziegelgrus	1150	995	1300	1160	2050	1940	2625	2370
	625		925		1600		2050	
Erde	1700	1310	2000	1460	2200	2020	2655	2390
	1125		1225		1775		2050	
Gedämpfte Erde	1675	1320	1875	1555	2300	2100	2600	2420
	1125		1250		1825		2225	

Die Hg-Beizmittel üben offensichtlich eine fördernde Wirkung auf die Entwicklung und das Wachstum des Koleoptilzylinders aus, denn die Messungen führten bei gebeizten Samen zu wesentlich höheren Werten. Außerdem machten diese Jungpflanzen einen viel kräftigeren und gesünderen Eindruck als die aus ungebeizten Samen hervorgegangenen, an denen vielfach eine große Anzahl gelber, kranker Gewebeteile wahrgenommen wurde. Geringerer Dickendurchmesser und auffallende Glanzlosigkeit des Koleoptilzylinders ließen die ungebeizten Versuchsglieder leicht erkennen.

3. Untersuchungen über das Regenerationsvermögen vier Wochen alter Gerstenpflanzen von ungebeiztem und gebeiztem Saatgut

In der folgenden Versuchsreihe wurde der Einfluß der Samenbeizung auf das Regenerationsvermögen junger Gerstenpflanzen untersucht, wobei die Frage zu klären war, ob die Beizung auch bei bereits einige Wochen alten Pflanzen noch positive Effekte zeigt. Die Samen wurden zum Keimen in ungedämpfte und gedämpfte Erde ausgelegt, nach vier Wochen an der Erdoberfläche abgeschnitten und weiterhin unter optimalen Wachstumsbedingungen gehalten. Die gebeizten Versuchsglieder zeigten schon nach drei bis vier Tagen gute Regenerationsansätze, während bei den ungebeizten eine starke Verzögerung eintrat. Bei Versuchsabschluß nach weiteren 14 Tagen hatten sich die Pflanzen der gebeizten Versuchsglieder sehr gut regeneriert, die der ungebeizten waren in ihrem Wachstum stark zurückgeblieben und wiesen einen schlechten Gesundheitszustand auf. Eine Anzahl schädlicher Pilze entwickelte sich an den Jungpflanzen der ungebeizten Versuchsglieder, griff die verletzten Gewebestellen an, bildete an den Pflanzenstummeln Myzel, welches die ganze Erdoberfläche der Versuchsgefäße bedeckte und den ohnehin schon geschwächten Widerstand der Pflanzen brach, wodurch eine Regeneration stark beeinträchtigt wurde (Abb. 3 und 4).

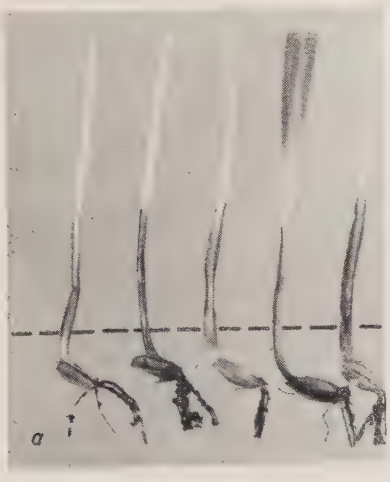
Der schädlichste Pilz, der auch die Koleoptilenbräune an jungen Gerstenpflanzen hervorruft, ist *Gibberella zeae* (Schw.) Petch. Von diesem Organismus befallene Samen und Jungpflanzen wurden in kurzer Zeit völlig zerstört.

Abb. 3. Regeneration junger Gerstenpflanzen 14 Tage nach dem Abschneiden. Aufsicht. a) ungebeizt, b) gebeizt

Abb. 4. Regeneration junger Gerstenpflanzen 14 Tage nach dem Abschneiden. Seitenansicht. a) ungebeizt, b) gebeizt

Pflanzen, die vor dem Abschneiden braune, kranke Stellen zeigten (Abb. 5), regenerierten nur in ganz seltenen Fällen. Durch Beizung wurde *Gibberella zeae* vernichtet. Pflanzen aus gebeizten Samen regenerierten sehr gut und blieben auch nachher gesund, obwohl an den Wurzeln eine üppige *Aspergillus*- und *Penicillium*-Entwicklung festzustellen war. Eine vergleichende Gegenüberstellung der beiden Versuchsglieder „ungebeizt" und „gebeizt" ist in den Abbildungen 3 bis 6 gegeben.

Abschließend kann festgehalten werden, daß Pflanzen aus ungebeizten Samen eine allgemein schwächere Widerstandskraft, geringere Turgeszenz und Frische sowie einen schlechteren Gesundheitszustand besitzen als gebeizte.



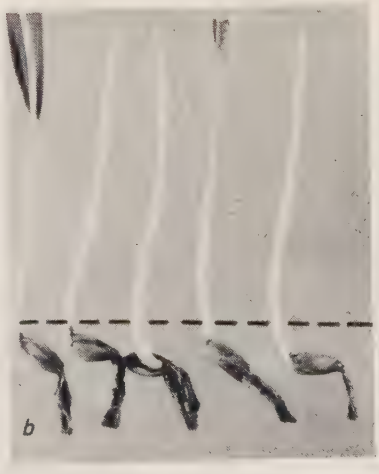


Abb. 5 und 6. (— — —) Stelle, an der junge Gerstenpflanzen für den Regenerationsversuch abgeschnitten wurden. a) ungebeizt und von *Gibberella zeae* befallen. b) gebeizt und gesund

Sie werden bei stärkeren Verletzungen sehr schnell von saprophytischen und parasitischen Mikroorganismen angegriffen und vernichtet, selbst bei Verwendung eines hochwertigen Saatgutes.

C. UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE AUSWIRKUNG EINER SAATGUTLAGERUNG BEI ERHÖHTER LUFTFEUCHTIGKEIT

1. Keimfähigkeit und Triebkraft

Diese Versuche sollten zur Feststellung der Beizmittelwirkung auf Keimfähigkeit und Triebkraft der Samen und Ausschaltung von samenbegleitenden Mikroorganismen bei erhöhter Luftfeuchtigkeit dienen. Als Versuchsmaterial wurden zwei Gerstenherkünfte (Gießen und Göttingen) gleicher Sorte mit unterschiedlichem Mikroorganismenbesatz genommen. Die Lagerung erfolgte in Neubauerschalen mit jeweils 350 g Saatgut. Die Einstellung der Luftfeuchtigkeit erfolgte nach WALTER (1931) in der Weise, daß in die mit Samen gefüllten Neubauerschalen ein Becherglas mit einer für die jeweilige Luftfeuchtigkeit geeichten Flüssigkeit eingebracht wurde. Die Schalen wurden mittels einer mit Vaselinering versehenen Glasplatte so verschlossen, daß an zwei Stellen der Abdichtungsring unterbrochen war, um genügenden Luftzutritt zu gewährleisten. Die Versuche standen bei Zimmertemperatur (20 bis 22 °C). Die Feuchtigkeit wurde, ausgehend von 75 %, jeweils um 5 % erhöht auf 80 %, 85 %, 90 %, 95 % und 100 %. Als Kontrolle wurde ein unter natürlichen Bedingungen auf dem Speicher gelagertes Saatgut der gleichen Posten verwendet.

Das Saatgut nahm im Laufe der Zeit in den Feuchtigkeitskammern beträchtliche Wassermengen auf. Eine nach sechs Wochen entnommene Probe beider Gerstenherkünfte zeigte bei 100 % Luftfeuchtigkeit bereits einen Feuchtigkeitsgehalt von 23,5 % bei der Herkunft Gießen bzw. 21,9 % bei der Herkunft Göttingen.

Zur Keimfähigkeit konnte festgestellt werden, daß die Kontrollen und die bei niederer Luftfeuchtigkeit gehaltenen Versuchsglieder ihre anfänglich

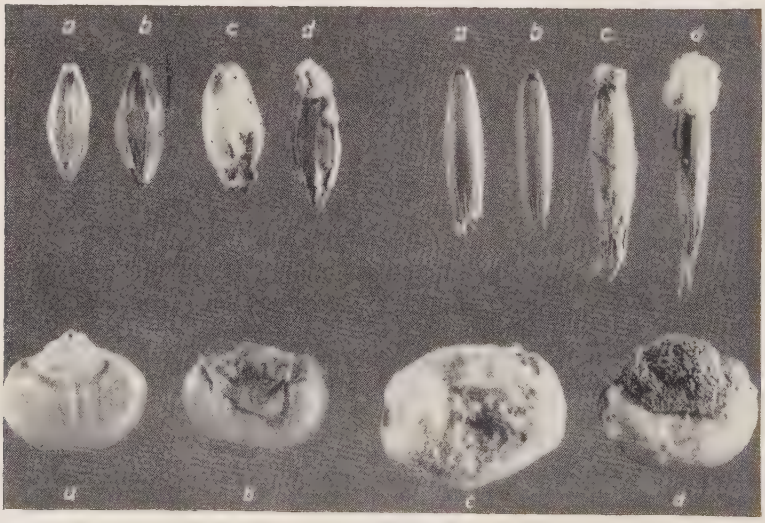


Abb. 7. Gerste, Hafer und Mais vor der Lagerung bei hoher Luftfeuchtigkeit: a = ungebeizt, b = gebeizt nach sechsmonatiger Lagerungszeit: c = ungebeizt, d = gebeizt

ermittelten hohen Werte hielten (Roth 1958). Während bei höherer Luftfeuchtigkeit schon nach sechs Wochen Lagerung vor allem in Sand und Ziegelgrus ein starker Abfall bei „ungebeizt" eintrat, zeigten die Versuchsglieder „gebeizt" im allgemeinen beachtlich höhere Werte.

An ungebeizten Samen findet bei höherer Luftfeuchtigkeit (von 85 % bis 100 %) eine starke Verschiebung der Mikroflora zugunsten der Pilze statt (Tab. 3a, 3b, 3c). Die Bakterienflora nimmt mit zunehmender Luftfeuchtigkeit (90 % bis 100 %) während der ersten Wochen der Lagerung zu, sinkt dann aber im Laufe der Zeit stark ab. Nach sechsmonatiger Lagerungszeit sind die Bakterienzahlen stark reduziert, während die Pilze die höchste Entwicklung erreicht haben. Es scheint hier eine gewisse Wechselbeziehung zwischen Bakterien und Pilzen vorzuliegen, wie auch Morgenthaler (1918) und Spicher (1956) feststellen konnten.

Bei ungebeiztem Saatgut, das bei hoher Luftfeuchtigkeit lagerte, zeigte sich schon nach einigen Tagen eine rege Pilzentwicklung, während das gebeizte Saatgut erst nach längerer Zeit einen Pilzbefall mit Vertretern der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium* aufwies. Diese Arten besiedeln das Samenkorn zuerst in der Embryoregion (Abb. 7d). Von hier breiten sie sich über das ganze Korn aus. Wie aus den Versuchen hervorgeht, haben sie eine geringere keimschädigende Wirkung als die auf ungebeiztem Samen vorkommenden Gattungen (Abb. 7c). Ungebeizte Samen wurden bei einer Lagerung unter hoher Luftfeuchtigkeit von einem dichten Pilzmyzel eingeschlossen, die Keimfähigkeit ließ stark nach und ging im Laufe der Zeit verloren. Pilzvermehrung und Samenzersetzung an gebeiztem Saatgut sind wesentlich geringer. Daraus resultieren auch die höheren Keimfähigkeitswerte (Roth 1958) und der bessere Gesundheitszustand der gebeizten Versuchsglieder (Abb. 3 bis 7).

2. Beobachtungen über die Zusammensetzung der Mikroflora

Nach den geschilderten Verhältnissen stellen die Samen bei feuchter Lagerung ein leicht verderbliches Gut dar. Bei dem Nährstoffreichtum der Samen vermehren sich Bakterien, Actinomyceten, Pilze, Hefen, Infusorien, Milben usw. stark. Im Folgenden soll untersucht werden, in welchem Ausmaß die samenbegleitende Mikroflora Veränderungen während der Lagerung erfährt.

Es wurde die Herkunft Gießen (Gerste Haisa II) gewählt. Tabelle 3 a—c zeigt die Keimzahlen nach Lagerung von sechs Wochen und sechs Monaten. Bei ungebeiztem Saatgut veränderte sich die Bakterienflora nach sechs Wochen Lagerungszeit bei niederen Luftfeuchtigkeiten von 75 bis 85 % nur unwesentlich. Die Werte lagen sehr nahe am Kontrollwert. Mit 85 % Luftfeuchtigkeit stieg die Zahl der Pilze und mit 90 % die Zahl der Bakterien an und erreichte bei 100 % rel. L. die Höchstzahl mit 51 Millionen je g Saatgut. Gegensinnig verhalten sich die Zahlen bei gebeiztem Saatgut. Ein starkes Absinken der Keimzahlen ist selbst bei Kontrolle „gebeizt" zu beobachten. Ein noch stärkerer relativer Rückgang der Zahlen wurde bei Proben aus hohen Luftfeuchtigkeiten festgestellt.

Die Prüfung nach sechsmonatiger Lagerungszeit zeigte ein um so stärkeres Zurückgehen der Bakterien, je höher die Luftfeuchtigkeit war. Ein Absinken

Tabelle 3a

Bakterienbesatz von ungebeizter und gebeizter Gerste (Haisa II), Herkunft Gießen, nach Lagerung bei erhöhter Luftfeuchtigkeit

Rel. Luftfeuchtigkeit in %	Anfangskeimgehalt		Keimgehalt nach 6 Wochen		Keimgehalt nach 6 Monaten	
	ungebeizt	gebeizt	ungebeizt	gebeizt	ungebeizt	gebeizt
Kontrolle	$4{,}3 \times 10^7$	$1{,}8 \times 10^7$	$3{,}9 \times 10^7$	$9{,}4 \times 10^6$	$2{,}5 \times 10^7$	$6{,}7 \times 10^6$
75	—	—	$3{,}8 \times 10^7$	$8{,}8 \times 10^6$	$2{,}2 \times 10^7$	$7{,}4 \times 10^6$
80	—	—	$3{,}4 \times 10^7$	$6{,}2 \times 10^6$	$3{,}6 \times 10^7$	$2{,}3 \times 10^6$
85	—	—	$3{,}5 \times 10^7$	$5{,}8 \times 10^6$	$3{,}8 \times 10^7$	$3{,}1 \times 10^6$
90	—	—	$4{,}1 \times 10^7$	$5{,}4 \times 10^6$	$9{,}2 \times 10^6$	$4{,}0 \times 10^6$
95	—	—	$4{,}8 \times 10^7$	$5{,}9 \times 10^6$	$6{,}8 \times 10^6$	$3{,}2 \times 10^6$
100	—	—	$5{,}1 \times 10^7$	$5{,}8 \times 10^6$	$5{,}6 \times 10^6$	$7{,}9 \times 10^5$

Tabelle 3b

Actinomycetenbesatz von ungebeizter und gebeizter Gerste (Haisa II), Herkunft Gießen, nach Lagerung bei erhöhter Luftfeuchtigkeit

Rel. Luftfeuchtigkeit in %	Anfangskeimgehalt		Keimgehalt nach 6 Wochen		Keimgehalt nach 6 Monaten	
	ungebeizt	gebeizt	ungebeizt	gebeizt	ungebeizt	gebeizt
Kontrolle	$1{,}6 \times 10^6$	$7{,}9 \times 10^5$	$1{,}3 \times 10^6$	$5{,}8 \times 10^5$	$8{,}2 \times 10^5$	$5{,}7 \times 10^5$
75	—	—	$1{,}5 \times 10^6$	$4{,}2 \times 10^5$	$7{,}6 \times 10^5$	$4{,}9 \times 10^5$
80	—	—	$1{,}8 \times 10^6$	$3{,}9 \times 10^5$	$8{,}2 \times 10^5$	$3{,}4 \times 10^5$
85	—	—	$1{,}2 \times 10^6$	$4{,}2 \times 10^5$	$1{,}9 \times 10^6$	$3{,}8 \times 10^5$
90	—	—	$2{,}1 \times 10^6$	$2{,}9 \times 10^5$	$3{,}2 \times 10^5$	$2{,}1 \times 10^5$
95	—	—	$9{,}5 \times 10^5$	$2{,}3 \times 10^5$	$1{,}4 \times 10^6$	$9{,}8 \times 10^4$
100	—	—	$3{,}7 \times 10^5$	$2{,}6 \times 10^4$	$5{,}9 \times 10^4$	$3{,}9 \times 10^3$

Tabelle 3c

Pilz- und Hefenbesatz von ungebeizter und gebeizter Gerste (Haisa II), Herkunft Gießen, nach Lagerung bei erhöhter Luftfeuchtigkeit

Rel. Luftfeuchtigkeit in %	Anfangskeimgehalt		Keimgehalt nach 6 Wochen		Keimgehalt nach 6 Monaten	
	ungebeizt	gebeizt	ungebeizt	gebeizt	ungebeizt	gebeizt
Kontrolle	$4{,}2 \times 10^5$	$6{,}2 \times 10^1$	$5{,}8 \times 10^5$	$3{,}5 \times 10^1$	$2{,}8 \times 10^5$	$3{,}1 \times 10^1$
75	—	—	$5{,}3 \times 10^5$	$2{,}1 \times 10^1$	$3{,}9 \times 10^5$	$5{,}3 \times 10^1$
80	—	—	$6{,}4 \times 10^5$	$7{,}3 \times 10^1$	$3{,}3 \times 10^5$	$2{,}6 \times 10^2$
85	—	—	$8{,}7 \times 10^5$	$9{,}4 \times 10^3$	$1{,}2 \times 10^6$	$3{,}4 \times 10^4$
90	—	—	$1{,}3 \times 10^6$	$6{,}4 \times 10^4$	$3{,}7 \times 10^6$	$4{,}8 \times 10^5$
95	—	—	$2{,}7 \times 10^6$	$3{,}4 \times 10^5$	$6{,}2 \times 10^6$	$9{,}7 \times 10^5$
100	—	—	$2{,}9 \times 10^6$	$3{,}1 \times 10^5$	$5{,}7 \times 10^6$	$9{,}2 \times 10^5$

von 51 Millionen auf 5,6 Millionen bei ungebeizt und von 5,8 Millionen auf 790 000 Keime bei gebeizt läßt die großen Veränderungen der samenbegleitenden Mikroflora sowohl durch Beizung als auch durch eine lange Lagerungszeit erkennen.

Auch bei den Actinomyceten ist eine abnehmende Tendenz nach längerer Lagerung festzustellen. Die Beizwirkung auf die Actinomyceten war aber viel geringer als auf Bakterien (Tab. 3b). Erst nach langer Lagerung und bei einer Luftfeuchtigkeit von 100 % konnte eine stärkere Beizwirkung auf diese Mikroorganismen festgestellt werden.

Betrachtet man die Ergebnisse der Tabelle 3c, dann fällt der enorme Anstieg der Pilzzahlen bei den Luftfeuchtigkeitsstufen 85 % bis 100 % auf. Nach sechs Wochen lagen die ermittelten Pilzkeime in der höchsten Luftfeuchtigkeitsgruppe und ungebeizt bei 2,9 Millionen und nach sechsmonatiger Lagerung bei 5,7 Millionen pro g Saatgut. Die gebeizten Versuchsglieder zeigten eine wesentlich geringere Zahl von Pilzkeimen. Selbst bei höchster Luftfeuchtigkeit konnten nach sechs Wochen Lagerung nur Werte von 310 000 und nach sechs Monaten 920 000 Keime registriert werden. Die Hg-Beizung bietet also für längere Zeit, vor allem gegen saprophytische, samenentwertende Pilze, einen beachtlichen Schutz.

D. DIE SAMENBEGLEITENDE MIKROFLORA

Wie aus der Literatur zu entnehmen ist, hat Hoffmann (1896) die ersten Untersuchungen über samenbegleitende Mikroorganismen durchgeführt. Er untersuchte eine Anzahl Getreidearten (Roggen, Weizen, Hafer, Gerste) verschiedener Herkunft, ohne jedoch Angaben über die gefundenen Arten zu machen. Die erste diagnostische Differenzierung mit kurzen Beschreibungen machte Chrzaszcz (1902). Aus dieser Arbeit geht bereits hervor, daß nicht nur die Zahl, sondern auch die Mannigfaltigkeit der Organismen bei den verschiedenen Herkünften starken Schwankungen unterworfen ist. Düggeli (1904) fand bei seinen Untersuchungen neben *Bacterium herbicola aureum* und *Bacterium herbicola rubrum* noch *Bacterium fluoreszenz* und einige andere Arten, die er auf physiologische Eigenschaften prüfte. Untersuchungen von Morgenthaler (1918) lassen bei einem gesunden Saatgut auf eine einzige Bakterienart (*Bacterium herbicola*) schließen, während er bei einem muffigen Getreide eine Vielzahl von Pilzen beobachtete. Die Untersuchungen von Spicher (1956) zeigten große Differenzen bei einer vergleichenden Gegenüberstellung der einzelnen Herkünfte.

Die eigenen Untersuchungen an den acht Gerstenherkünften zeigten eine Vielzahl verschiedener Arten von Bakterien (Kurz-, Mittellang- und Langstäbchen, Kokken), Actinomyceten, verschiedene Pilze und Hefen, Infusorien und Milben. Es war nicht möglich, alle Mikroorganismen einer genaueren Bestimmung zu unterziehen und sie auf ihre samenpathogenen Eigenschaften zu untersuchen. Es mußte hierfür eine Auswahl der offensichtlich wichtigsten Arten getroffen werden. Aus der Bakteriengruppe mit 467 Isolanten wurden 45 näher auf ihre morphologischen und physiologischen Eigenschaften geprüft. Als weitere Gruppe wurden die Pilze einer exakten Prüfung unterzogen. Die oft sehr stark vertretenen Actinomyceten wurden bei der Keimzählung wohl berücksichtigt, jedoch aus arbeitstechnischen Gründen nicht weiter verfolgt. Da aber auch diese Mikroorganismengruppe einen sicher nicht unbedeutenden Einfluß auf die Samenentwertung haben dürfte, weil der

muffige Geruch des Getreides nach eigenen Beobachtungen dem einer Anzahl von Actinomycetenstämmen sehr ähnlich ist, sollen ihre Einflüsse auf das Saatgut in einer weiteren Arbeit untersucht werden.

Die Mikroorganismenstämme wurden durch Plattenpassagen gereinigt. Die Überprüfung der Reinkulturen erfolgte nach dem von Janke (1946) angegebenen Verfahren unter mikroskopischer Kontrolle. Die Sporenbildner konnten durch hohe Temperaturen leicht von den übrigen Bakterien isoliert werden.

Nährmedien

1. Bakterien
   a) Bouillon-Agar (Hallmann 1953)
   b) 1/3-Dextrose-Agar: 0,3 % Liebigs Fleischextrakt, 0,4 % Pepton Witte, 0,07 % Kochsalz, 0,4 % Dextrose und 1,8 % Agar. pH-Wert 7,2.
   c) Kartoffel-Dextrose-Agar (KDA): 50 % Kartoffelsaft, 3,0 % Dextrose, 1,8 % Agar. pH-Wert 6,9.
2. Actinomyceten
   a) 1/3-Dextrose Agar. pH-Wert 7,2.
   b) Agar nach Conn (1916) und Plotho (1940).
3. Pilze
   a) Kartoffel-Dextrose-Agar wie oben. pH-Wert 5,8 bis 6,0.
   b) Biomalz-Agar: Janke (1946) mit Zugabe von Karottensaft. pH-Wert 5,8.
   c) Czapek-Dox-Agar und Czapek-Dox-Lösung nach Janke (1946).

1. Differenzialdiagnostische Methoden zur Bestimmung der Bakterien

In den vielen Aufschwemmungsreihen konnte die Bakterienflora schon nach 24 bis 36 Stunden auf 1/3-Dextrose-Agar deutlich wahrgenommen werden. Die Spezialisten, Actinomyceten und eine Anzahl von Pilzen entwickelten sich langsamer und waren bei der ersten Auszählung noch nicht zu erfassen. Deshalb und aus den bei der Ermittlung des Mikroorganismenbesatzes genannten Gründen wurde die letzte Auszählung und viele Isolierungen erst am 18. Tage vorgenommen. Die einzelnen Arten ließen sich nach dieser Zeit viel besser unterscheiden. Es war vor allem die Kenntnis der morphologischen, biochemischen und physiologischen Eigenschaften wichtig. Diese Untersuchungen und Reaktionen wurden mit Hilfe geeigneter Literatur (Bergey 1948, Dorner 1933, Hallmann 1953, Janke 1946, Meyn 1952, Richter 1954, Tillmanns und Ohnesorge 1943) durchgeführt. Zur Untersuchung kamen 18 bis 24 Stunden alte Bakterienkulturen, die bei 30° C auf 1/3-Dextrose-Agar gewachsen waren.

Die Zelleigenschaften wurden registriert nach Form, Größe, Wuchsverbänden, Beweglichkeit, Sporenbildung und Gramfärbung. Weiterhin wurde das Wachstum der Kolonien nach Form, Größe, Randbildung, Lage, Struktur und Farbe (nach Ostwald 1926, 1928) bestimmt.

Die Prüfung der physiologischen Eigenschaften beschränkte sich auf Wachstum in flüssigem Nährmedium, festem Nährboden in

Petrischalen und Schrägagar und in Gelatinestichkultur (Beobachtungszeit 60 Tage); Wachstum auf Spezialnährböden; Kohlenhydratvergärung: Gas- und Säurebildung im flüssigen Nährmedium nach vorangegangener Entzuckerung des Grundnährbodens mittels *Bacterium coli*. Folgende Kohlenhydrate wurden geprüft: Arabinose, Rhamnose, Xylose, Glukose, Fruktose, Galaktose, Mannose, Laktose, Saccharose, Maltose, Raffinose, Stärke, Inulin, Pektin, Sorbitol, Äthylalkohol, Propylalkohol, Butylalkohol. Weiterhin wurden die Stämme nach dem IMVC-Verfahren (Indolreaktion, Methylrotprobe, Voges-Proskauer-Reaktion und Citratprobe) nach Hallmann (1953) und Richter (1954) geprüft. Außerdem erfolgte die Prüfung des Verhaltens in Lackmusmilch, Wachstum in Traubenzucker-Essigsäurebouillon, Nitritbildung aus Nitraten, Celluloseabbau auf Filtrierpapier, Wachstum auf McConkey-Agar, Wachstum auf Endoagar, Katalasebildung, Eijkman-Probe, Farbstoffbildung, Thermoresistenz bei 71 °C 2,5 Minuten. Sämtliche Nährsubstrate wurden vor ihrer Beimpfung einige Tage durch Bebrütung bei 30 °C auf ihre Sterilität geprüft.

Von den 45 geprüften Bakterien-Arten wurde keine als identisch mit einer anderen befunden. Die gelbwachsenden Bakterien werden allem Anschein nach in der älteren Literatur als *Bacterium herbicola* angesprochen. Es handelt sich aber hier zweifellos um eine Vielzahl von verschiedenen Gattungen und Arten, wie aus eigenen Untersuchungen ersichtlich ist (Roth 1958).

Einige Besonderheiten sollen hier noch kurz erwähnt werden. Von allen geprüften Bakterien treten drei Stämme durch ihre wasserlösliche grüne Pigmentbildung hervor. Nach den vorliegenden Untersuchungen handelt es sich hier um die Gattung *Pseudomonas*. Sie unterscheiden sich in einigen Reaktionen voneinander und müssen als drei verschiedene Arten der genannten Gattung angesprochen werden. Diese drei Arten fallen einerseits durch ihre mehr oder minder ausgeprägte Farbstoffbildung, andererseits durch die stammweise verschieden starke Abscheidung antibiotisch wirksamer Stoffwechselprodukte auf. Diese physiologischen Eigenschaften der genannten Arten verdienen nach verschiedenen Gesichtspunkten näher untersucht zu werden, da sie sich auch in der Anzahl der Farbstoffkomponenten nach der chromatographischen Testmethode wesentlich unterscheiden.

2. Differenzialdiagnostische Methoden zur Pilzbestimmung

Die Pilzbestimmung wurde bei Fusarien bis zur Gattung nach Wollenweber und Reinking (1935), bei allen übrigen Pilzen nach Lembke und Delitsch (Delitsch 1943), sowie nach Lindau (1922), die der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium* nach Niethammer (1949) durchgeführt.

Mikroskopische Untersuchung

Die Untersuchung der Pilzkulturen erfolgte nach einer von mir abgewandelten Objektträgermethode in folgender Weise: fettfreie, gut gereinigte, 22 mm große Deckgläschen werden durch die schwache Bunsenbrennerflamme gezogen. Mit einer sterilen Präpariernadel wird sterile, erkaltete Vaseline in dünner Schicht auf die vier Deckglasecken aufgetragen und jeweils ein kleines

Bruchstück eines 18 mm Deckgläschens so aufgesetzt, daß es an der Vaselinestelle hängenbleibt. Die oberen Seiten dieser vier Deckglasfragmente werden nun wieder mit etwas Vaseline bestrichen, je ein etwa 1 mm^3 großes Stückchen Agar auf das Deckgläschen aufgetragen und mit der zu untersuchenden Pilzkultur beimpft. Darauf wird ein steriler Objektträger gelegt und angedrückt. Die Objektträger werden in einer feuchten Kammer (Küvette) aufgestellt und bei 22 bis 24 °C bebrütet. Die auf diesem plattgedrückten Nährboden wachsenden Kulturen sind durch ihre nach allen Seiten wachsenden Konidienträger mit Konidien für Untersuchungen am lebenden Organismus gut geeignet. Die meisten an Gerstenkaryopsen vorkommenden Pilze konnten nach dieser Methode bis zur Gattung bestimmt werden. Es waren folgende Gattungen vertreten: *Aspergillus, Botrytis, Cladosporium, Epicoccum, Fusarium, Gibberella, Mucor, Syncephalastrum, Stemphylium, Trichothecium, Phyllosticta, Penicillium* und *Verticillium*. Die Bestimmung bis zur Art erfolgte in Spezialinstituten der Biologischen Bundesanstalt und dem Centraalbureau voor Schimmelcultures in Baarn (Holland).

Die an Gerstenkaryopsen vorkommenden Pilze

Stamm-Nummer	Gattung und Art
X	*Gibberella zeae* (Schw.) Petch. (Syn. *G. saubinetii* [Mon.] Sacc.), perfekte
63	Form von *Fusarium graminearum* Schwabe
52	*Aspergillus amstelodami* (Mangin) Thom et Church
55	*Aspergillus candidum* Link
19	*Aspergillus repens* (Cda.) de Bary
11	*Botrytis cinerea* Pers.
43	*Cladosporium herbarum* Link
42	*Epicoccum nigrum* Link
35	*Fusarium avenaceum* (Mr.) Sacc.
36	*Fusarium equiseti* (Cda.) Sacc.
40	*Fusarium oxysporum* Schl.
2, 29, 31, 38	*Mucor varians* Pispek
21, 26	*Penicillium* (*Pfefferianus*-Gruppe): Monoverticillata
23, 78	*Penicillium* (*Notatum*-Gruppe): Asymmetrica
4, 7	*Penicillium* (*Elegans*-Gruppe): Symmetrica
3, 10, 24	*Penicillium* (*Chrysogenum*-Gruppe): Symmetrica
27	*Penicillium* (*Luteum*-Gruppe): Symmetrica
59 *)	*Penicillium* (*Purpurigenum*-Gruppe): Symmetrica
70 *)	*Phyllosticta* spec.
22	*Stemphylium consortiale* (Thüm.) Groves et Skolko
45	*Syncephalastrum racemosum* (Cohn) Schreit.
54	*Trichothecium roseum* Link
0	*Verticillium cinnabarinum* (Cda.) Reinke et Berth.

*) Da in der Literatur über die zwei hier erwähnten *Phyllosticta*-Arten keine näheren Beschreibungen vorliegen, konnten diese beiden Pilze selbst in Baarn nicht bis zur Art bestimmt werden. Es handelt sich um zwei verschiedene *Phyllosticta*-Arten, die sich in der Größe der Pycnosporen unterscheiden.

Besondere Aufmerksamkeit wurde der qualitativen Zusammensetzung der Pilzflora an den verschiedenen Herkünften geschenkt. Die meisten Pilzisolanten kommen bei fast allen Herkünften als Begleitorganismen vor, wie folgende Aufstellung zeigt.

Herkunft Pilz Nr.	Dikopshof	Gießen	Göttingen	Hohenheim	Kiel	Lindenhof	Monsheim	Weihenstephan
X	+	+	+	+	+	—	—	+
0	+	+	—	+	+	+	+	+
2 } *)	+	+	+	+	+	+	+	+
3 }	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+
11	—	+	—	+	+	+	—	+
19	—	—	+	+	—	+	+	+
22	+	+	+	—	—	+		—
35	—	+	+	—	—	—	+	—
36	+	+	—	—	+	+	—	—
40	+	+	+	+	—	+	+	+
42	—	+	+	+	—	+	—	—
43	+	+	—	—	+	+	—	—
45	+	+	—	+	+	+	—	+
52	+	+	+	+	+	+	—	+
54	—	+	—	+	+	+	—	—
55	—	+	—	+	—	+	+	+
59	+	—	+	—	—	—	—	+
63	+	+	+	+	—	—	+	+
70	+	—	+	—	—	—	—	+

*) Penicillien verschiedenster Arten kommen auf allen Herkünften vor. Wegen der vielen Arten, die an Gerstenkaryopsen vorkommen und sich sehr ähnlich sind, kann auf die Herkunft dieser Arten nicht eingegangen werden.

E. UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINFLUSS VERSCHIEDENER MIKROORGANISMEN IN REINKULTUR AUF DIE KEIMUNG VON GERSTE

Die vorangestellten Abschnitte dieser Arbeit haben einen bedeutenden Einfluß der samenbegleitenden Mikroflora auf Samen und Keimling erkennen lassen. In den folgenden Versuchen soll nunmehr geprüft werden, welche Wirkung Reinkulturen der wichtigsten an Samen gefundenen Mikroorganismen auf Keimung und allgemeinen Gesundheitszustand des jungen Keimlings ausüben können. Die Versuche fanden einige Zeit nach der Isolierung der Organismen statt mit einem trocken gelagerten Saatgut, das durch Oberflächensterilisation soweit wie möglich von seiner Begleitflora befreit war. Als Keimgefäße dienten mit Filtrierpapier ausgelegte, bzw. mit Sand gefüllte sterile Petrischalen, ferner Tontöpfe für Ziegelgrusversuche.

1. Bakterien

Für die Infektionsversuche wurden 18 bis 24 Stunden alte Bakterienkulturen benutzt. Der Bakterienbelag von Schrägkulturen wurde mit Wasser abgeschwemmt, die Suspension mit gewünschten Mengen sterilem Wasser verdünnt und als Quellungswasser den Samen beigegeben. Um einen besseren Anhaltspunkt über die zugegebenen Mengen Bakterienbelag zu erhalten, wurde mit „Vollösen" gearbeitet. Eine Vollöse (Durchmesser 3 mm) ist etwa $^1/_8$ bis $^1/_{10}$ einer Schrägagarkultur.

Kleine Mengen (1 Vollöse auf 100 ccm steriles Wasser) des Bakterienbelages blieben auf oberflächensterilem und nicht sterilem Saatgut ohne Einfluß. Die Samen keimten gleichmäßig gut, und die Werte wichen nur unwesentlich voneinander ab. Eine Wirkung konnte erst bei höheren Impfmengen (4 Vollösen = $^4/_{10}$ eines Schrägagarkulturbelages) einiger Stämme bei oberflächensterilem Saatgut (Tab. 5) mit einer Bakteriensuspension vom gesamten Belag eines Schrägröhrchens auf 100 ccm sterilen Wassers und mehr beobachtet werden. Von den genannten Aufschwemmungen wurden dann 6 ccm in die Petrischalen gegeben. Die für Ziegelgrusversuche vorgesehenen Samen wurden vier Stunden in entsprechender Bakteriensuspension vorgequollen.

Von den 45 geprüften Bakterienstämmen wurden nur diejenigen in die Tabellen 4 (Prüfung bei oberflächlich nicht sterilisiertem Saatgut) und 5 (Prüfung bei oberflächlich sterilisiertem Saatgut) aufgenommen, welche einen bestimmten Einfluß auf den Samen oder den Keimling ausüben. Drei Bakterienarten (2, 30, 37) fallen durch ihren starken Einfluß auf Keimung und Keimling auf. Sie zeigen auf Filtrierpapier und in Sand eine stark keimhemmende Wirkung. Selbst Keimprozente und allgemeiner Gesundheitszustand werden von diesen Organismen deutlich negativ beeinflußt. Eine weitere Anzahl Bakterien zeigt einen unwesentlichen Einfluß auf Keimung und einen geringen auf den allgemeinen Gesundheitszustand, während die Mehrzahl der Bakterien bei einer Impfmenge von 4 Vollösen überhaupt keinen oder einen sogar leicht fördernden Einfluß ergibt. Eine besonders günstige Wirkung auf die Keimung zeigt Bakterium Nr. 1 — identifiziert als *Bacillus cereus* var. *mycoides* (Roth 1958). Alle Wiederholungen ergeben Pflanzen, die der Kontrolle wenig, aber doch deutlich an Größe und gesundem Aussehen voraus sind. Auch die Keimprozente liegen etwas höher als die der Kontrolle.

Bei den gebeizten Versuchsgliedern konnte durch Bakterien weder auf die Keimung noch auf den allgemeinen Gesundheitszustand eine hemmende Wirkung festgestellt werden.

Aus einer Gegenüberstellung der Befunde in den Tabellen 4 und 5 wird der verschieden starke Einfluß einer Infektion mit Bakterienreinkulturen auf Keimprozente, Entwicklung des Keimlings und dessen Gesundheitszustand ohne und mit vorheriger Saatgutsterilisation ersichtlich. Es wird deutlich, daß die Schäden bei sterilisiertem Saatgut allgemein stärker sind, daß also die einzelnen Organismen in Reinkultur dem Keimling um so mehr schädlich werden können, je weniger sie durch andere Konkurrenten gestört werden.

Tabelle 4

Einfluß von Bakterienreinkulturen

auf die Keimung und den Gesundheitszustand von oberflächlich nicht sterilisiertem Gerstensaatgut (Haisa II). Prüfung in Petrischalen auf Filtrierpapier. Gebeizt mit Ceresan

Bakterien Stamm Nr.	Keimprozente nach 10 Tagen		Bonitierung des Keimlings[1])		Allgemeiner Gesundheitszustand[2])	
	ungebeizt	gebeizt	ungebeizt	gebeizt	ungebeizt	gebeizt
Kontrolle	89,5	90,0	1,5	1,5	I	I
Bakt. 1	90,0	93,0	1,0	2,5	I	I
Bakt. 2	71,0	87,5	4,0	3,0	II/III	I
Bakt. 3	83,4	92,0	1,5	2,0	I	I
Bakt. 4	92,0	93,0	1,0	2,0	I	I
Bakt. 5	88,0	91,5	1,5	2,0	I	I
Bakt. 9	85,0	92,5	1,0	2,5	I/II	I
Bakt. 10	83,2	91,5	2,0	2,5	I/II	I
Bakt. 11	78,5	88,5	2,0	2,5	II	I
Bakt. 14	87,4	89,5	1,0	2,5	I	I
Bakt. 15	85,5	85,0	2,0	2,0	I	I
Bakt. 16	90,5	92,0	1,0	2,0	I	I
Bakt. 17	82,5	89,0	1,5	2,5	I	I
Bakt. 19	86,0	88,5	1,0	2,5	I/II	I
Bakt. 24	85,5	89,5	1,5	2,5	I	I
Bakt. 26	84,5	89,0	1,5	2,5	I/II	I
Bakt. 27	86,0	87,5	1,0	2,5	I/II	I
Bakt. 28	85,5	91,0	1,5	2,5	I/II	I
Bakt. 30	73,5	86,5	4,0	2,5	III	I
Bakt. 33	90,0	89,5	1,0	3,0	I	I
Bakt. 37	81,0	91,5	3,0	2,5	II/III	I
Bakt. 43	81,0	87,5	1,0	2,5	II	I
Bakt. 45	83,5	90,5	1,5	2,5	II	I

Bewertungsschema:

[1]) Keimling: 1 = sehr gut entwickelt, 2 = gut entwickelt, 3 = mangelhaft entwickelt, 4 = schlecht entwickelt.

[2]) Allgemeiner Gesundheitszustand: I = keine Krankheitssymptome, II = krank weniger als 10 %, III = krank weniger als 25 %, IV = krank weniger als 40 %, V = krank mehr als 40 %.

Ein weiterer Versuch (Tab. 6) mit höheren Impfmengen (eine Schrägagar-Reagenzglaskultur wurde in 50 ccm sterilem Wasser aufgeschwemmt) bestätigte die schädigende Wirkung der drei *Pseudomonas*-Arten. Ein weiteres Bakterium (Nr. 16), welches in Versuchen mit geringerer Suspension keinen schädlichen Einfluß hatte, zeigte nunmehr schon bei unsteriler Gerste beträchtliche Schäden. Viel stärker treten diese Schäden an von seiner natürlichen Mikroflora befreitem Saatgut auf (Tab. 6). Hohe Impfmengen richten bei nicht sterilem Saatgut weit weniger Schaden an. Die Keimprozente sinken von 85 % auf 52,0, 48,0 und 47,5 %; bei sterilem Saatgut und ungebeizt von

Tabelle 5

Versuche mit oberflächensterilem Saatgut

Bakterien Stamm Nr.	Keimprozente nach 10 Tagen		Bonitierung des Keimlings		Allgemeiner Gesundheitszustand	
	ungebeizt	gebeizt	ungebeizt	gebeizt	ungebeizt	gebeizt
Kontrolle	86,0	88,5	1,5	2,0	I	I
Bakt. 1	88,5	91,0	1,0	2,5	I	I
Bakt. 2	35,5	79,0	4,0	2,5	IV	II
Bakt. 3	73,5	85,0	2,5	2,5	III	I
Bakt. 4	85,0	89,0	1,5	2,0	I	I
Bakt. 5	77,0	85,0	2,0	2,5	II	I
Bakt. 9	75,0	85,0	2,0	2,5	III	I
Bakt. 10	72,5	86,5	2,0	2,5	III	I
Bakt. 11	69,0	83,0	2,5	2,5	III	I
Bakt. 14	75,0	86,5	2,0	2,5	II/III	I
Bakt. 15	81,5	89,5	2,0	2,5	II	I
Bakt. 16	72,0	87,5	2,5	2,5	III	I
Bakt. 17	64,5	86,0	2,5	2,0	III	I
Bakt. 19	76,5	89,5	2,0	2,5	II	I
Bakt. 24	69,0	83,5	2,0	2,5	II	I
Bakt. 26	74,5	86,5	2,0	2,5	II	I
Bakt. 27	82,0	85,0	2,0	2,5	II	I
Bakt. 28	80,0	86,5	2,0	2,5	I/II	I
Bakt. 30	46,5	75,5	4,0	2,5	IV	I
Bakt. 33	79,0	88,0	2,0	2,5	II	I
Bakt. 37	72,0	86,5	4,0	2,5	IV	I/II
Bakt. 43	75,5	86,0	2,5	2,0	II	I
Bakt. 45	74,0	88,5	2,0	2,5	II	I

87,5 % auf 6,0, 5,6 und 4,6 %. Die Werte von Bakterium Nr. 16 liegen wesentlich höher als die der drei *Pseudomonas*-Arten.

Die zusätzliche Wirkung der Beizung ist wiederum eine sehr positive. Zwar ist auch hier ein geringes Absinken der Keimprozente zu beobachten, das aber in keinem Verhältnis zu dem von „ungebeizt" steht. Selbst bei sterilem Saatgut konnten die Keimprozente ganz angemessene Werte erreichen (Tab. 7). Der Gesundheitszustand ist ebenfalls gut. Selbst nach Infektion mit sonst schädlich wirkenden Bakterienstämmen bleiben die Samen und Keimlinge ohne Krankheitssymptome.

Die in Ziegelgrus durchgeführten Versuche ergaben demgegenüber keine wesentlichen Unterschiede. Doch wurde auch hier wieder die schon in Abschnitt B) erwähnte Verbesserung der Turgeszenz des Koleoptilzylinders festgestellt.

2. Pilze

Die von Gerstenkaryopsen isolierten Pilze wurden in Nährlösung (Czapek-Dox und Biomalz 1 : 1) bei 24 °C sechs Wochen lang in 150 ccm großen

Tabelle 6

Einfluß von Bakterienreinkulturen

auf Keimung und Gesundheitszustand von Gerstensaatgut (Haisa II). Prüfung in Petrischalen auf Filtrierpapier. Gebeizt mit Ceresan. Bakteriensuspension 1 : 50*)

Bakterien Stamm Nr.	Keimprozente nach 10 Tagen		Bonitierung des Keimlings		Allgemeiner Gesundheitszustand	
	ungebeizt	gebeizt	ungebeizt	gebeizt	ungebeizt	gebeizt
	Nicht steriles Saatgut					
Kontrolle	85,5	96,0	1,0	1,5	I	I
Bakt. 2	52,0	83,5	4,0	2,0	III	I
Bakt. 30	48,0	80,0	4,0	2,0	III	I
Bakt. 37	47,5	87,5	4,0	2,0	III	I
Bakt. 16	76,0	93,0	2,0	1,5	II	I
	Steriles Saatgut					
Kontrolle	78,5	89,0	1,5	2,0	I	I
Bakt. 2	6,0	67,5	5,0	2,5	V	I
Bakt. 30	5,6	74,0	5,0	2,5	V	I
Bakt. 37	4,6	76,5	5,0	2,5	V	I
Bakt. 16	43,7	79,5	3,0	2,0	II	I

*) Eine Schrägagarkultur wurde in 50 ccm sterilem Wasser aufgeschwemmt und als Quellungswasser den Versuchsgliedern beigegeben.

Erlenmeyerkolben gezüchtet. Die 20 ccm Lösung war innerhalb dieser Zeit völlig vom Pilzmyzel durchzogen. Nach Zugabe von 100 ccm sterilem Wasser und kräftigem Schütteln wurde die Flüssigkeit mit Pilzmyzel und Sporen durch Gaze filtriert und in Mengen von jeweils 6 ccm den Versuchsgliedern zugegeben. Fast alle Pilze besaßen einen bedeutend stärkeren negativen Einfluß auf das Saatgut als die Bakterien. Sehr geringe Widerstandskraft zeigte auch hier oberflächensterilisiertes Saatgut (Tab. 8). Schon innerhalb von zwei Tagen war an den ihrer natürlichen Mikroflora beraubten Körnern eine rege Zersetzung wahrzunehmen. Die geringen Keimprozente, die schlechte Keimlingsentwicklung und der schlechte Gesundheitszustand geben Aufschluß über die verheerende Wirkung (Tab. 7 und 8). Die Werte heben ferner den positiven Einfluß der Hg-Beizung hervor. In den Filtrierpapierversuchen fällt hier wiederum die hemmende Wirkung der Beizung auf Keimlings- und Wurzelentwicklung auf. Der Gesundheitszustand ist dagegen immer sehr gut. Nur in ganz seltenen Fällen liegt die Bewertung unter II.

In Ziegelgrus zeigte die Beizung ihre volle Wirksamkeit sowohl auf Keimfähigkeit als auch auf Keimlingsentwicklung und allgemeinen Gesundheitszustand (Tab. 9). Während bei den ungebeizten Versuchsgliedern die Werte bei den meisten Pilzen IV (also mehr als 25 % kranke Keimlinge) und V (mehr als 40 % kranke Keimlinge) betragen, liegen sie bei trocken gebeizten

Versuchsgliedern zwischen I und II (nicht mehr als 5 % kranke Keimlinge). Am stärksten werden wiederum ungebeizte, von ihrer natürlichen Mikroflora durch vorherige Oberflächensterilisation befreite Samen betroffen (Tab. 9).

Den größten Schaden verursacht *Gibberella zeae*. Es folgen die *Fusarium*-Arten, *Verticillium cinnabarinum*, einige *Penicillium*-Arten, *Cladosporium herbarum* und *Stemphylium consortiale*. Aber auch die übrigen Pilze wie *Epicoccum nigrum*, *Aspergillus*-Arten, *Trichothecium roseum* usw. zeigen eine negative Wirkung (Tab. 7, 8, 9).

Die Hg-Beize ist verhältnismäßig wenig wirksam gegen die Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium*. Davon erwiesen sich bei den *Penicillium*-Arten besonders widerstandsfähig Vertreter der *Luteum*-Gruppe, die auch den allgemeinen Gesundheitszustand des Keimlings negativ beeinflußten.

Tabelle 7

Einfluß von Pilzreinkulturen

auf die Keimung und den Gesundheitszustand von oberflächlich nicht sterilisiertem Gerstensaatgut (Haisa II). Prüfung in Petrischalen auf Filtrierpapier. Gebeizt mit Ceresan

Pilze Stamm Nr.	Keimprozente nach 10 Tagen		Bonitierung des Keimlings		Allgemeiner Gesundheitszustand	
	ungebeizt	gebeizt	ungebeizt	gebeizt	ungebeizt	gebeizt
Kontrolle[1])	94,5	94,0	1,5	2,0	I/II	I
Kontrolle[2])	91,0	92,0	2,0	2,5	I/II	I
Pilz X	67,0	86,0	4,0	2,0	V	I/II
Pilz 0	69,5	92,0	3,5	2,0	V	I/II
Pilz 3	75,0	88,0	3,5	2,0	IV	I/II
Pilz 4	85,0	90,0	1,0	2,5	I/II	I
Pilz 7	87,5	89,5	1,0	2,5	I	I
Pilz 10	90,5	90,0	1,0	2,5	I/II	I
Pilz 11	79,5	89,0	2,0	2,5	I/II	I
Pilz 22	85,0	87,5	1,5	2,5	I/II	I
Pilz 23	92,0	91,5	1,0	2,0	I	I
Pilz 24	78,0	89,5	2,0	2,5	I/II	I
Pilz 26	89,0	90,0	1,0	2,5	I	I
Pilz 31	89,0	88,5	1,0	2,5	I	I
Pilz 35	67,5	88,0	3,5	2,5	IV	I/II
Pilz 36	68,0	90,5	3,5	2,0	IV	I
Pilz 40	92,5	91,0	1,5	2,0	II	I
Pilz 42	89,5	89,0	1,5	2,0	I/II	I
Pilz 43	76,5	91,0	2,5	2,0	III	I
Pilz 45	84,5	88,0	1,5	2,5	I/II	I
Pilz 50	93,0	91,5	1,0	2,5	I	I
Pilz 52	87,0	89,5	1,5	2,0	II	I
Pilz 54	80,0	91,5	3,0	2,0	III	I
Pilz 63	73,0	88,5	3,0	2,0	III	I

[1]) Reines Leitungswasser als Quellungsflüssigkeit.
[2]) 20 ccm Czapek-Dox: Biomalzlösung ohne Pilze auf 100 ccm Wasser.

3. Der Einfluß von Rohkulturen

Während Reinkulturen von Bakterien, abgesehen von den drei *Pseudomonas*-Arten, dem Samen wenig Schaden zufügten, änderte sich das Bild völlig bei Verwendung von Rohkulturen. Ungebeizte Samen gingen schon nach zwei bis drei Tagen in Zersetzung über. Schleim- und Bläschenbildung sowie ein unangenehmer Geruch setzten ein. Eine völlige Zerstörung des Saatgutes war die Folge.

Das Impfmaterial für Rohkulturversuche wurde wie folgt gewonnen: Gerstenkörner der Herkunft Gießen wurden auf Reisschleim mit Bouillonzusatz in Petrischalen ausgelegt und bei 26 °C bebrütet. Es fand dann eine intensive Entwicklung der samenbegleitenden Mikroflora statt. Nach fünf Tagen wurde etwas Material entnommen und für Infektionsversuche in sterilem Wasser aufgeschwemmt.

Die Versuchsergebnisse zeigten auch hier eine viel schnellere Zersetzung eines oberflächensterilen Saatgutes im Vergleich zu einem solchen, das seiner natürlichen Begleitflora nicht beraubt war. Am längsten geschützt vor einer samenzerstörenden Mikroflora waren die gebeizten Samen.

Tabelle 8

Wie in Tabelle 7, jedoch mit sterilisiertem Saatgut

Pilze Stamm Nr.	Keimprozente nach 10 Tagen		Bonitierung des Keimlings		Allgemeiner Gesundheitszustand	
	ungebeizt	gebeizt	ungebeizt	gebeizt	ungebeizt	gebeizt
Kontrolle[1])	84,5	89,0	1,5	2,0	I	I
Kontrolle[2])	80,0	88,5	1,5	2,0	I	I
Pilz X	38,5	84,0	4,0	2,5	V	I/II
Pilz 0	51,0	89,0	4,0	2,5	V	I
Pilz 3	47,0	82,5	4,0	2,5	V	I
Pilz 4	76,5	88,0	2,0	2,5	II	I
Pilz 7	78,0	86,5	1,5	2,0	II	I
Pilz 10	86,5	86,0	1,5	2,0	I/II	I
Pilz 11	76,0	90,0	2,0	2,5	II	I
Pilz 22	74,5	87,0	1,5	2,5	II	I
Pilz 23	89,0	88,0	1,5	2,5	I	I
Pilz 24	85,5	87,5	1,5	2,5	I/II	I
Pilz 26	88,5	90,0	1,5	2,5	I	I
Pilz 31	82,0	86,5	1,5	2,5	I/II	I
Pilz 35	43,5	87,0	3,5	2,5	IV	I/II
Pilz 36	47,0	84,5	3,5	2,5	IV	I/II
Pilz 40	76,5	88,0	2,0	2,5	II	I
Pilz 42	84,5	87,5	2,0	2,5	I/II	I
Pilz 43	69,5	85,0	2,0	2,5	I/II	I
Pilz 45	73,0	87,0	1,5	2,5	II	I
Pilz 50	82,5	89,0	1,5	2,5	I/II	I
Pilz 52	84,0	88,5	1,5	2,0	I/II	I
Pilz 54	48,5	87,0	3,5	2,0	IV	I
Pilz 63	65,5	83,0	3,5	2,5	III/IV	I/II

Tabelle 9

Einfluß von Pilzreinkulturen
auf die Keimung und den Gesundheitszustand von sterilisiertem Gerstensaatgut (Haisa II).
Prüfung in Ziegelgrus. Gebeizt mit Ceresan

Pilze Stamm Nr.	Keimprozente nach 14 Tagen		davon erkrankt		Allgemeiner Gesundheitszustand	
	ungebeizt	gebeizt	ungebeizt	gebeizt	ungebeizt	gebeizt
Kontrolle 1	93,0	95,0	16,0	1,0	III	I/II
Kontrolle 2	94,5	96,0	20,0	0,5	III	I
Pilz X	83,5	96,0	68,5	3,0	V	I/II
Pilz 0	93,0	95,5	46,5	3,0	V	I/II
Pilz 3	96,0	95,5	16,0	0,0	IV	I
Pilz 4	95,0	96,5	28,0	1,0	IV	I/II
Pilz 7	92,0	95,0	49,5	7,0	V	I/II
Pilz 10	92,0	96,5	50,5	5,0	V	I/II
Pilz 22	92,5	93,0	77,5	10,5	V	III
Pilz 23	91,0	93,0	42,5	3,0	V	I/II
Pilz 24	96,0	95,0	43,0	16,0	V	III
Pilz 26	93,0	96,5	51,0	0,5	V	I
Pilz 31	92,0	92,0	18,5	1,5	III	I/II
Pilz 35	91,5	90,5	38,5	2,5	IV	I/II
Pilz 36	92,0	94,5	46,5	8,5	V	II
Pilz 40	97,0	92,0	43,0	11,5	V	III
Pilz 42	93,0	92,0	73,0	17,5	V	III
Pilz 43	97,5	93,5	43,5	3,0	V	I/II
Pilz 45	94,5	95,0	37,5	1,5	IV	I/II
Pilz 50	94,5	95,5	12,5	2,0	III	I/II
Pilz 52	94,5	94,0	37,0	2,5	IV	I/II
Pilz 54	96,0	95,0	31,5	0,5	IV	I/II
Pilz 63	92,5	95,0	28,0	3,5	IV	I/II

III. Diskussion der Ergebnisse

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß die Hg-Beizung außer ihrer Wirksamkeit gegen die bekannten mit dem Saatgut übertragbaren Pilze noch einige Nebenwirkungen auf den Keimling und das erste Jugendwachstum der Pflanzen hat. Die Angaben einer Anzahl Autoren wurden bestätigt. Auf die Frage, ob es sich bei den beobachteten Nebenwirkungen um Ausschaltung einer schädlichen Mikroflora handelt oder um andere Faktoren, konnte nur von der mikrobiologischen Seite her beantwortet werden. Die in der Regel beobachtete Hebung der Keimprozente durch Hg-Beizung kann in den meisten Fällen dadurch bedingt werden, daß die Samen nicht so schnell der Mikroflora zum Opfer fallen. Die schützende Wirkung der Beizmittel ermöglicht es auch solchen Samen, deren Embryonen durch Nekrosen geschwächt

sind und unter erschwerten Keimbedingungen bald vernichtet würden, längere Zeit im Keimbett frisch zu bleiben und zu keimen.

Eine oft in der Literatur zitierte „Stimulationswirkung" auf das Längenwachstum der Pflanzen konnte mindestens in den ersten Tagen nicht beobachtet werden. Gebeizte Versuchsglieder zeigten meistens sogar eine leichte Keimverzögerung. Die Nebenwirkungen der Hg-Beizung werden erst nach 10 bis 14 Tagen sichtbar. Ein frischeres, kräftigeres Aussehen der Jungpflanzen, kräftigere und turgeszentere Koleoptilzylinder und vermehrtes Wurzelwachstum sind zu beobachten. Während normalerweise je Pflanze in Ziegelgrus sechs Wurzeln gezählt wurden, stieg die Wurzelzahl bei den gebeizten auf sieben an.

Hierfür sind neben einer Ausschaltung der Mikroflora auch andere Faktoren verantwortlich zu machen, doch ist eine vollständige Deutung der vorliegenden Befunde nicht möglich. Immerhin soll nicht versäumt werden, an dieser Stelle auf die Ergebnisse und Gedankengänge der Enzymforscher und Physiologen hinzuweisen (Zusammenfassung bei Roth 1958). Versuche mit Samen niederer Keimfähigkeit lassen besonders starke Unterschiede zwischen ungebeizt und gebeizt erkennen. Eine Erklärung hierfür kann aus den Befunden von Ruge (1948, 1952) gegeben werden, der feststellte, daß ältere Samen sowohl in ihrer Keimfähigkeit als auch an Wirkstoffgehalt abnehmen. „So wird der Gehalt an Auxin, Biowuchsstoffen, Vitamin B_1 und C sowie der an keimungsauslösenden Hormonen verringert". Solche Samen liegen also bedeutend längere Zeit im Keimbett, bis sie keimen können. Sie werden schon auf Grund der längeren Keimungsdauer und ihrer geschwächten Embryonen leichter von Mikroorganismen befallen und vernichtet. Der positive Einfluß der Hg-Beizung liegt nun allem Anschein nach einerseits in einer Aktivierung der Wirkstoffe (Ruge 1952), andererseits in der Ausschaltung oder Hemmung schädlicher Mikroorganismen.

Der negative Einfluß der Mikroflora zeigt sich um so mehr, je ungünstiger die Keimbedingungen sind. Hierüber geben Untersuchungsbefunde in feuchtem Keimmedium Aufschluß. Eine schnelle Zersetzung des ungebeizten Saatgutes ist die Folge. Im Zusammenhang damit steht auch eine Veränderung des Keimbett-pH-Wertes. Durch den schnellen Abbau organischer Bestandteile des Samens werden Säuren als Zwischenprodukte gebildet.

Die Bedeutung der Hg-Beizung auf das Regenerationsvermögen junger Pflanzen zeigten entsprechende Versuchsergebnisse. Die von Anfang an schwächer gewachsenen Pflanzen mit weniger Widerstandskraft und vielen Krankheitssymptomen aus ungebeizten Samen wurden durch das Abschneiden so stark geschwächt, daß sie nur langsam und schwach regenerierten oder schon nach kurzer Zeit der Vernichtung anheimfielen, während die gebeizten Versuchsglieder viel schneller regenerierten und aus dem anfälligen Wachstumsstadium herauswuchsen. Auch hier hing die bessere Widerstandskraft der gebeizten Versuchsglieder von einer gewissen Aktivierung der Wirkstoffe in der Pflanze selbst ab.

Die Zusammensetzung der auf den Samen vorhandenen Mikroorganismenflora nach Zahl und Art kann recht verschieden sein. Je nach Lagerungs- und Keimungsbedingungen werden die einen in ihrer Entwicklung gefördert, die anderen gehemmt. Das biologische Gleichgewicht verschiebt sich unter erhöhter Luftfeuchtigkeit meistens zugunsten der Pilze, die mittels ihrer stark samenzersetzenden Eigenschaften große Schäden anrichten können.

Bei einer Prüfung der von Gerste isolierten Mikroorganismen auf ihre keimschädigende Wirkung erwiesen sich unter der Vielzahl der Bakterien nur drei als schädlich. Sie können nach vorliegenden Untersuchungsbefunden in die Gattung *Pseudomonas* eingereiht werden. Alle anderen Bakterien verhielten sich, abgesehen bei hohen Impfmengen, neutral oder sogar wachstumsfördernd, so z. B. *Bacillus cereus* var. *mycoides*. Die Actinomyceten wurden nicht weiter untersucht; dieses soll einer späteren Arbeit vorbehalten bleiben.

Die meisten der von Gerste isolierten Pilze zeigten in Reinkultur einen schädlichen Einfluß. Ob nun diese Einflüsse auf die Aktivität der einzelnen Pilze selbst oder auf etwaige Stoffwechselprodukte zurückzuführen sind, muß weiteren Arbeiten überlassen werden. Den schädlichsten Einfluß zeigte *Gibberella zeae*, die in sechs von acht Herkünften vorkam. *Verticillium cinnabarinum* konnte hauptsächlich an bei höherer Luftfeuchtigkeit gelagertem Saatgut beobachtet werden. Weiterhin zeigten *Fusarium*, einige *Penicillium*-Arten, *Trichothecium roseum*, *Cladosporium herbarum* und andere einen negativen Einfluß auf den Gesundheitszustand des Keimlings. Alle Pilze außer einigen *Aspergillus*- und *Penicillium*-Arten erwiesen sich als sehr empfindlich gegenüber Hg-Beizmitteln. Die beiden letztgenannten Gattungen setzten dagegen zu ihrer üppigen Entwicklung sogar eine Beizung voraus. Der Einfluß der Mikroorganismen ließ sich am besten in Keimmedien prüfen, die eine geringe Absorptionskraft haben wie Filtrierpapier, Sand und Ziegelgrus. In Erde waren die Unterschiede bedeutend geringer, in gedämpfter Erde jedoch stärker, da das biologische Gleichgewicht dort gestört ist.

Die Prüfung der Rohkulturen erfolgte nach Anzucht auf halbfestem Reisbouillon-Nährboden. Auf diesem Nährboden war ein sehr gutes Wachstum der samenbegleitenden Mikroflora zu beobachten. Der Vorteil gegenüber einem Gerstennährboden besteht darin, daß der Reisnährboden ganz weiß und selbst ohne Agar verhältnismäßig fest ist. Ein Gerstennährboden zeigt dagegen immerhin eine Vielzahl kleiner brauner Kleieflocken, die leicht mit Bakterienkolonien verwechselt werden können.

Die Schadwirkung der Rohkulturen war in den meisten Fällen stärker als die der Reinkulturen. Diese Beobachtung steht in einem gewissen Widerspruch zu denen, wo ein seiner natürlichen Mikroflora nicht beraubtes Saatgut günstigere Ergebnisse zeigte. Dies läßt sich nur so erklären, daß in Reisbouillon-Nährboden die samenschädlichen Mikroorganismen in den ersten Tagen gleich die Überhand gewinnen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen mit aller Deutlichkeit, daß ungebeiztes Saatgut selbst unter günstigen Keimbedingungen niedrigere Keimpro-

zente als gebeiztes aufweist. Je ungünstiger die Keimbedingungen sind, um so eindeutiger zeigt sich die positive Wirkung der Hg-Beizung durch Zurückdrängung bzw. Selektion der Mikroflora, vor allem aber der schädlichen Pilzflora.

Zusammenfassung

Ziel vorliegender Arbeit war, einen Beitrag über den Einfluß der Hg-Beizung auf Lagerung, Keimung und Jugendentwicklung der Gerste, besonders aber auf deren samenbegleitende Mikroflora zu liefern. Die an acht aus gleichem Saatgut stammenden Gerstenherkünften durchgeführten Untersuchungen hatten folgende Ergebnisse:

1. Alle geprüften Hg-Trockenbeizmittel wirkten sich in den für die Versuche benutzten Keimmedien in den ersten Tagen hemmend auf Keimung und Jugendwachstum aus. Am deutlichsten war diese Hemmung auf Filtrierpapier, dann in Sand und Ziegelgrus und am geringsten schließlich in Erde.

2. Schon nach 10 bis 14 Tagen ändern sich diese Verhältnisse völlig. Die gebeizten Pflanzen wachsen kräftiger und zeigen ein bedeutend frischeres Aussehen in Sand, Ziegelgrus und Erde. Auf Filtrierpapier dagegen bleibt die hemmende Wirkung der Beizung bestehen.

3. Der Einfluß der Hg-Beizung besteht in

a) einer Selektion der samenbegleitenden Mikroorganismenflora, wobei die meisten der fakultativ pathogenen Arten ausgeschaltet werden,

b) einer Förderung von Keimung und Jugendwachstum, die mindestens teilweise unabhängig von der Ausschaltung schädlicher Mikroorganismen zu sein scheint.

4. Zur Frage der samenbegleitenden Mikroorganismen wurden folgende Ergebnisse erzielt:

a) Gesunde Gerstensamen aller acht Herkünfte zeigten eine üppige Mikroorganismenvegetation aus einer Vielzahl verschiedener Arten von Bakterien, Actinomyceten, Pilzen und Hefen. Dazu traten noch Protozoen, Milben und in einigen Fällen Älchen.

b) Es wurden isoliert 467 Bakterien, 150 Actinomyceten, 47 Pilze und 12 Hefen. 45 Bakterienstämme wurden auf ihre morphologischen und physiologischen Eigenschaften geprüft, 31 Pilze bis zur Art bestimmt und ihr Vorkommen auf den einzelnen Herkünften registriert.

c) Eine Methode zur mikroskopischen Pilzuntersuchung wurde beschrieben, die gegenüber den bekannten Kammermethoden (Objektträger mit Hohlraum und Böttcherschen Kammer) den Vorteil hat, daß die Konidienträger am lebenden Präparat deutlicher zu sehen sind.

d) Bei Untersuchungen über den Einfluß der Mikroorganismenarten in Reinkultur auf nicht steriles und steriles Saatgut wirkten von den 45 Bakterienstämmen bei geringen Impfmengen nur drei (zur Gattung *Pseudomonas* gehörende) Arten schädlich auf Keimung und Jugendwachstum der Gerste. Dabei traten die Schäden bei sterilem Saatgut viel stärker in Erscheinung. Die Schädigung steigerte sich mit zunehmender Menge an Infektionsmaterial. In höheren Suspensionen wirkten auch andere Bakterienarten schädlich (Tab. 6).

e) Einige Bakterienarten zeigten bei geringen Impfmengen sogar einen fördernden Einfluß auf Keimung und Gesundheitszustand der Gerste (Tab. 4 und 5).

f) Von den isolierten Pilzen sind die meisten in Reinkultur für Keimung und Wachstum der Gerste schädlich, ausgenommen einige *Penicillium*-Arten. Den schädlichsten Einfluß übte *Gibberella zeae* aus. Dieser Pilz kann mit Sicherheit als die Hauptursache der Koleoptilenbräune und des Absterbens junger Gerstenpflanzen gelten (Abb. 5a). Durch Hg-Beizung wird er in seiner Entwicklung stark gehemmt. Schädlich auf Gesundheitszustand und Entwicklung wirkten sich unter den Pilzen weiter aus: Vertreter der Gattungen *Fusarium, Verticillium, Trichothecium, Cladosporium, Aspergillus, Epicoccum, Stemphylium, Syncephalastrum, Penicillium* (bestimmte Spezies) und *Mucor* (Tab. 7 bis 9).

g) Die Zugabe von Rohkulturen bewirkt innerhalb von zwei bis drei Tagen eine Zersetzung der Samen.

h) Bei feuchter Lagerung erhöht sich bei Gerste anfänglich die Zahl der Pilze und Bakterien. Bei weiterer Zunahme der Feuchtigkeit geht die Bakterienzahl zugunsten der Pilzflora zurück.

i) Die Beizung wirkt sich fördernd aus auf die Pilze der Gattung *Aspergillus* und *Penicillium*, die bei einer Lagerung des Saatgutes unter hoher Luftfeuchtigkeit (über 85 %) schließlich unter den Pilzen allein das Feld beherrschen. Alle anderen Arten werden durch die Beizung geschädigt. Dies gilt auch für die Bakterien, besonders bei höheren Feuchtigkeitsgraden.

j) Unter extrem feuchten Lagerungsbedingungen behält gebeiztes Saatgut seine Keimfähigkeit länger als ungebeiztes, da seiner schnellen Zersetzung durch Mikroorganismen Einhalt geboten wird. Hierbei kann auch eine Veränderung des pH-Wertes des Keimbetts bei Beizung festgestellt werden.

5. Zur Frage einer allgemein günstigen Wirkung der Beize auf das Gerstensaatgut der acht Herkünfte wurden folgende Feststellungen gemacht:

a) Eine günstige Wirkung der Hg-Beize auf Keimprozente und Triebkraft zeigte sich besonders bei Saatgut mit geringerer Keimfähigkeit und nach feuchter Lagerung.

b) Pflanzen aus gebeizten Körnern zeigten bei allgemein kräftigerem Wuchs im einzelnen Erhöhung der Wurzelzahl, besseres Haften der Wurzelhaare an Ziegelgrus, größeren Durchmesser des Koleoptilzylinders, besseres Wachstum und erhöhtes Regenerationsvermögen beim Abschneiden im Alter von vier Wochen.

c) Es ist möglich, daß diese Nebenwirkungen der Beizung auch unabhängig von der Niederhaltung der Mikroorganismenflora auftreten können.

Summary

The purpose of the foregoing work was to render a contribution to the knowledge of the influence of Hg dusting on storage, germination, and juvenile development of barley, and also especially on the seedaccompanying microflora. The experiments carried out on eight sets of barley originating from the same seed batch had the following results:

1. All the tested Hg dry-dusting preparations, during the first days, had an inhibitory effect on germination and juvenile growth in all the germination media used for the experiments. This inhibition was most obvious on filterpaper, then in sand and pulverized tile and finally least in soil.

2. After 10 to 14 days these relationships change completely. The dusted plants grow stronger and appear significantly more vigorous in sand, tilegrit and earth. On filterpaper, however, the inhibitory effect of dusting perseveres.

3. The influence of Hg-dusting consists in

a) a selection of the seed-accompanying microflora whereby most of the facultative pathogenic species are eliminated,

b) an advancement of germination and juvenile growth which appears to be at least partially independent of the elimination of harmful micro-organisms.

4. Concerning the seed-accompanying micro-organisms the following results were obtained:

a) Healthy barley seeds from all eight experimental sets showed a luxuriant micro-vegetation including many different species of bacteria, actinomyces, fungi, and yeasts. In addition protozoa, mites and, in a few cases, nematodes also occurred.

b) 467 bacteria, 150 actinomycetes, 47 fungi, and 12 yeasts were isolated. The morphological and physiological characteristics of 45 forms of bacteria were examined, 31 fungi (moulds) were determined to species and their occurrence on each of the experimental barley groups recorded.

c) A method for microscopic investigation of fungi was described which, contrary to the known chamber method (microscope slide with con-

cavity and Böttcher-Kammer), has the advantage that the conidia receptacles are to be seen more easily in living preparations.

d) In investigations on the influence of micro-organisms in pure culture on unsterile and sterile seed materials, only three species (Genus: *Pseudomonas*) of the 45 bacterial forms had harmful effect on germination and juvenile growth of barley by light inoculation. Damage appeared much more intensely in sterile seed. The injuries increased progressively in infection material. Other bacteria also worked injuriously in higher suspensions (Tab. 6).

e) Some species of bacteria, by light inoculation, even showed a beneficial influence on germination and health of barley (Tabs. 4 and 5).

f) Most of the isolated moulds, in pure culture, are detrimental to germination and growth of barley except some species of *Penicillium*. The most harmful influence is exerted by *Gibberella zeae*. This mould certainly can be regarded as the chief cause of coleoptile browning and dying off of young barley plants. Its development is strongly inhibited by Hg-dusting. Other moulds which are injurious to health and development are: Representatives of the genera *Fusarium, Verticillium, Trichothecium, Cladosporium, Aspergillus, Epicoccum, Stemphylium, Syncephalastrum, Penicillium* and *Mucor* (Tabs. 7 to 9).

g) The addition of impure cultures brings about decomposition of the seed within two to three days.

h) When barley is stored under humid conditions, the numbers of moulds and bacteria initially rise. Further increase in humidity causes a decline in the number of bacteria to the benefit of the mouldflora (fungiflora).

i) The dusting has a furthering effect on moulds of the genera *Aspergillus* and *Penicillium* which on storage of the seed under higher air humidity (above 85 %), finally dominate the field, as far as the moulds are concerned. All other species are injured by the dusting. This is also true in the case of bacteria, especially at higher humidities.

j) Under extremely humid storage conditions, dusted seed maintains its germinating ability longer than undusted seed because its rapid decomposition by its micro-organisms content is checked. Because of this a change in the pH-value of the germination bed after dusting can also be established.

5. Concerning the question of a generally favourable effect of dusting on the barley seed of the eight batches, the following facts were established:

a) A favourable effect of Hg-dry-dusting on percentage of germination and growing power is revealed especially in seed with inferior germination ability and after humid storage.

b) Plants from dusted grains exhibited a generally sturdier stature and individually an increase in the number of roots, a better adhesiveness of the roothairs to tile particles, greater diameter of the coleoptile cylinders, better growth and enhanced regeneration ability after cutting at four weeks of age.

c) It is possible that these secondary effects of dusting also can occur independent on depression of the microflora.

Literaturverzeichnis

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1948, 6. Aufl., Baltimore.

Chrzaszcz, T., 1902: Die Mikroorganismen der Gerste und Malzkörner. Wschr. Brau. XIX, 40, 590—593.

Conn, J. J., 1916: A possible function of *Actinomycetes* in soil. J. Bact. **1**, 197—209.

Delitsch, H., 1943: Systematik der Schimmelpilze. In Lembke, A., Ergebnisse der Mikrobiologie I., J. Neumann, Neudamm.

Dorner, W., 1933: Methoden zur Untersuchung von Bakterienreinkulturen. Hannover, M. u. H. Schaper.

Düggeli, M., 1904: Die Bakterienflora gesunder Samen und daraus gezogener Keimpflänzchen. Cbl. Bakt. II. **12**, 602—614, 695—712 und **13**, 56—63, 198—207.

Eggebrecht, H., 1949: Methodenbuch V: Die Untersuchung von Saatgut. Neumann-Verlag, Radebeul und Berlin.

Hallmann, L., 1953: Bakteriologische Nährböden. Georg Thieme-Verlag, Stuttgart.

Hoffmann, F., 1896: Wie groß ist die Zahl der Mikroorganismen auf dem Getreide unter verschiedenen Bedingungen? Wschr. Brau. XIII, **44**, 1153—1155.

Janke, A., 1946: Arbeitsmethoden der Mikrobiologie I. Theodor Steinkopf Verl., Dresden und Leipzig.

Lakon, G., 1942: Topographischer Nachweis der Keimfähigkeit der Getreidefrüchte durch Tetrazoliumsalze. Ber. Dtsch. Bot. Ges. **60**, 299—305.

Lindau, G., 1922: Die mikroskopischen Pilze. Julius Springer Verl., Berlin.

Maier, F., 1950: Über den Einfluß von mechanischen Verletzungen auf Wasseraufnahme und Keimfähigkeitswerte der Getreidefrüchte. Saatgutwirtschaft **11**, 251—255.

Meyn, A., 1952: Bestimmungsschlüssel für die Gattungszugehörigkeit von Bakterien. Ferdinand Enke Verl., Stuttgart.

Morgenthaler, O., 1918: Über die Mikroflora des normalen und muffigen Getreides. Landw. Jb. Schweiz 551—573.

Niethammer, A., 1949: Die Gattung *Penicillium* Link. Eugen Ulmer-Verlag, Stuttgart.

Ostwald, W., 1926: Der Farbkörper. Verl. Anesma GmbH, Leipzig.

— —, 1928: Die Farbenfibel. Verl. Anesma GmbH, Leipzig.

Plotho, O. von, 1940: Beiträge zur Kenntnis der Morphologie und Physiologie der Actinomyceten. Arch. Mikrobiol. **11**, 33—72.

Richter, W., 1954: Die Kontrolle von Milch und Milchprodukten auf Bakterien der *Coli-Aerogenes*-Gruppe. Schweiz. Milchztg. 65—70.

Roth, G., 1958: Einfluß der Quecksilberbeizung auf Keimung und Jugendwachstum der Gerste unter besonderer Berücksichtigung ihrer selektiven Wirkung auf die samenbegleitende Mikroflora. Diss. Landw. Hochsch. Hohenheim.

Ruge, U., 1947: Untersuchungen über keimungsfördernde Wirkstoffe. Planta **35**, 297—318.

— —, 1948: Ergebnisse der Keimungsphysiologie. Naturw. Rdsch. **5**, 217—221.

— —, 1952: Über die Steigerung der Keimfähigkeit alten Saatgutes mit Hilfe von Äthylenchlorhydrin. Angew. Bot. **26**, 162—165.

Schütz, W., 1931: Über die Einwirkung von Beizmitteln auf Keimung und Wachstum von Weizen. Bot. Arch. **33**, 199—256.

Spicher, G., 1956: Vergleichende Untersuchungen über die Mikroflora des Getreides. Zbl. Bakt. II, **109**, 589—610.

Tillmanns, J., und G. Ohnesorge, 1943: Praktikum der klinischen chemischen, mikroskopischen und bakteriologischen Untersuchungsmethoden. 14. Aufl., Urban & Schwarzenberg, Berlin und Wien.

Walter, H., 1931: Die Hydratur der Pflanze. Jena, Verl. G. Fischer.

Wollenweber, H. W., und O. A. Reinking, 1935: Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung. Verl. Paul Parey, Berlin.

Aus der Biologischen Bundesanstalt,
Institut für Getreide-, Ölfrucht- und Futterpflanzenkrankheiten,
Kiel-Kitzeberg

Anatomische Untersuchungen über Eindringen und Ausbreitung von *Tilletia*-Arten in Getreidepflanzen in Abhängigkeit vom Entwicklungszustand der Wirtspflanze

Von

Frauke Hansen

Mit 19 Abbildungen

A. Einleitung

Neben den beiden Arten des gewöhnlichen Weizensteinbrandes *Tilletia caries* (DC.) Tul. und *Tilletia foetida* (Wallr.) Liro ist seit etwa 20 Jahren in Nordamerika und in anderen Gebieten, darunter auch in Süddeutschland, eine neue Form beobachtet worden: der Weizenzwergsteinbrand *Tilletia contraversa* Kühn. Wie sein Name andeutet, unterscheidet er sich äußerlich vom gewöhnlichen Steinbrand durch eine auffallende Verkürzung der von ihm befallenen Weizenhalme (Warmbrunn 30).

Wichtiger als diese Verzwergung der Wirtspflanze sind andere Unterschiede, die vor allem in der Keimungsphysiologie der Sporen liegen. Während der gewöhnliche Steinbrand in einem Temperaturbereich von etwa 3 bis 20 °C verhältnismäßig schnell keimt und geringe Lichtansprüche stellt, verläuft die Keimung beim Zwergsteinbrand weitaus langsamer. Sie setzt nur bei Temperaturen von weniger als 10 °C und unter der Einwirkung von Licht ein (3, 11, 12, 18, 19, 22) und bedingt dadurch eine vom gewöhnlichen Steinbrand abweichende Infektionsart.

Beide Formen befallen sehr junge Weizenkeimlinge. Beim gewöhnlichen Steinbrand verläuft die Keimung in so kurzer Zeit, daß sowohl die im Boden liegenden Sporen als auch diejenigen, die an der Kornoberfläche haften, nach der Aussaat infektionsfähige Stadien ausbilden können, bevor die junge Pflanze ihnen entwächst. Der Zwergsteinbrand dagegen ist durch seine langsamere Keimung nicht in der Lage, vom Korn aus eine Infektion hervorzurufen. Sie erfolgt in den meisten Fällen nur durch Sporen, die sich im Boden befinden und bei der Aussaat des Weizens bereits gekeimt sind.

Künstliche Infektionsversuche ergaben weitere Besonderheiten des Zwergsteinbrandes (Niemann 20). Inokulierte Keimlinge, bei tiefen Temperaturen von 0 bis 5 °C aufgestellt, zeigten nur einen geringen Prozentsatz

befallener Pflanzen. Wurden sie vor der Inokulation verletzt, so stieg der Infektionserfolg bis auf etwa 75 % an. Der gewöhnliche Steinbrand dagegen konnte auch bei etwas höheren Temperaturen und in unverletzten Pflanzen einen etwa 80%igen Befall bewirken. Es erhebt sich die Frage, welchen unterschiedlichen Einfluß verschiedene Temperaturen und Verletzungen auf das Wachstum der beiden Steinbrandarten in der Pflanze haben. Denkbar wäre, daß das Zwergsteinbrandmyzel im Gegensatz zum gewöhnlichen Steinbrand bei höherer Temperatur vorzeitig aufgelöst, das Wachstum der Wirtspflanze aber beschleunigt wird, so daß nur selten eine Infektion erfolgen kann. Auch könnte eine Verletzung die Wirtspflanze schwächen oder für das Eindringen des Parasiten günstige Bedingungen schaffen. Um diese Fragen zu klären, muß der Pilz von der Inokulation der Wirtspflanze bis zur Sporenbildung in allen Stadien verfolgt werden.

Untersuchungen über das Verhalten des gewöhnlichen Steinbrandes in der Wirts-Pflanze wurden u. a. von KÜHN (15), LANG (16), DASTUR (6), WOOLMAN (32) und GASSNER (10) angestellt. Sie berichten jedoch hauptsächlich über einzelne Abschnitte der Entwicklung und wenig über die Temperaturabhängigkeit der Vorgänge. KÜHN und WOOLMAN beschreiben die ersten Stadien des Eindringens, DASTUR die Kernverhältnisse dieser Phase, LANG die weitere Ausbreitung des Myzels im Keimling und in der älteren Pflanze und GASSNER Partialinfektionen und die Entstehung der Steinbrandbutten. Am Zwergsteinbrand wurden entsprechende Beobachtungen noch nicht gemacht.

Die vorliegende Arbeit über die Entwicklung verschiedener Steinbrandarten in ihren Wirtspflanzen soll diese Probleme klären. Sie wurde in den Jahren 1956 und 1957 im Institut für Getreide-, Ölfrucht- und Futterpflanzenkrankheiten der Biologischen Bundesanstalt in Kitzeberg durchgeführt. Für die Überlassung des Arbeitsplatzes danke ich dem Herrn Präsidenten der Biologischen Bundesanstalt, Prof. Dr. RICHTER.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. TISCHLER, danke ich für die Förderung, die er mir zuteil werden ließ. Vor allem möchte ich Herrn Dr. NIEMANN, unter dessen Anleitung die Arbeit ausgeführt wurde, für die mir stets bereitwillig gewährte Unterstützung meinen aufrichtigen Dank aussprechen.

B. Methodik

I. Material

Die Infektionen wurden mit folgenden in den Jahren 1955/56 in Kitzeberg vermehrten Steinbrandarten durchgeführt:

Weizenzwergsteinbrand *Tilletia contraversa* Kühn
Ausgangsherkunft: Württemberg
Gewöhnlicher Weizensteinbrand *Tilletia caries* (DC.) Tul.
Ausgangsherkunft: Magdeburg
Roggensteinbrand *Tilletia secalis* (Corda) Kcke.[1])
Ausgangsherkunft: Rauris, Österreich

[1]) NIEMANN (21) schlägt vor, die Zwergsteinbrandherkünfte von Roggen, Weizen, *Agropyron* sp. und *Hordeum bulbosum* in einer Sammelspezies zusammenzufassen, da die Zwergsteinbrandformen vom Weizen und von *Hordeum bulbosum* weder untereinander noch gegen den *Agropyron*-Steinbrand oder den Roggensteinbrand sicher abzugrenzen sind. In der vorliegenden Arbeit werden die bisher gebräuchlichen Bezeichnungen angewendet, weil dieser Vorschlag noch nicht allgemein anerkannt ist.

Folgende Wirtsarten wurden verwendet:

Vorversuche 1956:

Saatgut aus der Ernte 1955	
Winterweizen „General von Stocken"	anfällig für Zwergsteinbrand und gewöhnlichen Steinbrand

Hauptversuche 1957:

Saatgut aus der Ernte 1956	
Winterweizen „Ackermanns Herold"	anfällig für Zwergsteinbrand und gewöhnlichen Steinbrand
Winterweizen „Wasatsch"	resistent gegen Zwergsteinbrand (29), nicht anfällig für Roggensteinbrand
Winterroggen „Petkuser Normalstroh"	anfällig für Roggensteinbrand, nicht anfällig für Zwerg- und gewöhnlichen Steinbrand

II. Inokulationsmethode

Um eine Steinbrandinfektion der Getreidepflanzen zu erhalten, müssen infektionsfähige Stadien des Parasiten mit empfänglichen Stadien des Wirtes zusammengebracht werden. Infektionsstadien des Pilzes sind die aus den keimenden Sporen gebildeten Sporidien, anfällige Stadien der Wirtspflanze junge Keimlinge bis etwa 5 mm Länge. In den folgenden Versuchen wurde die Inokulation nach einer Methode von Niemann (20) durchgeführt. Ausführliche Angaben sind dort zu entnehmen.

a) Anzucht der infektionsfähigen Stadien des Pilzes (12)

Für Zwergsteinbrand: Die Butten wurden zerrieben, die Sporen mit Wasser zu einem Brei angerührt, in Petrischalen auf Schlämmboden aus lehmiger Ackererde ausgestrichen und bei einer Temperatur von 3 °C in einem dunklen Raum aufgestellt. Nach drei Wochen wurde die nötige Einwirkung des Lichtes durch Benetzen der Sporenausstriche mit einer wäßrigen Kaliumpermanganatlösung (10 %) ersetzt (13). Weitere drei bis vier Wochen später waren infektionsfähige Sporidien in genügender Anzahl ausgebildet.

Für gewöhnlichen Steinbrand: Die Sporen wurden in der gleichen Weise auf Schlämmboden ausgestrichen. Bei einer anschließenden Dunkelaufstellung bei 15 °C waren die Sporidien nach sechs bis acht Tagen entwickelt.

Für Roggensteinbrand: Sporenpulver wurde in Petrischalen mit Calciumnitratlösung (0,5 %) gestreut und bei einer Temperatur von 3 °C im Dunkeln aufgestellt. Nach sechs bis sieben Wochen war die Keimung abgeschlossen.

b) Anzucht der anfälligen Stadien der Wirtspflanzen

Die Körner wurden 20 Minuten in einer Formalinlösung (0,1 %) gebeizt, mit Wasser nachgewaschen und auf Fließpapier bei 15 °C zur Keimung ausgelegt. Nach drei bis vier Tagen hatten die Keimlinge eine Länge von 2 bis 5 mm erreicht.

c) Inokulation

Die Inokulation der Keimlinge wurde von November bis März durchgeführt. Die gebildeten Sporidien wurden mit Wasser vom Schlämmboden abgespült und die 2 bis 5 mm langen Pflanzen in diesen Brei getaucht, entweder unverletzt oder, durch Abschneiden der Koleoptilenspitze, verletzt. Beim gewöhnlichen Steinbrand wurden außerdem nach einer zweiten Methode ungekeimte Körner mit Sporenpulver eingepudert.

Die Keimlinge wurden in Mitscherlichgefäßen in einer Erdmischung von 2 Teilen Acker-, 2 Teilen Komposterde und 1 Teil Sand ausgelegt und mit mäßig feuchter Erde zugedeckt.

d) Weitere Aufstellung

Während der ersten 30 Tage nach der Inokulation erfolgte die Aufstellung der Keimlinge bei verschiedenen Temperaturen in dunklen Kühlzellen. Anschließend wurden sie ins ungeheizte Gewächshaus gebracht und Anfang Mai aufs Versuchsfeld umgepflanzt. Die Temperaturen der einzelnen Zellen betrugen:

Kühlzellen: 3 °C (mit Schwankungen von 2 ° bis 5 °C)
15 °C (mit Schwankungen von 15 ° bis 16 °C)

Gewächshaus: im Januar um 2 °C (nachts bis — 2 °, mittags bis 11 °C)
im April um 7 °C (nachts bis 0 °, mittags bis 25 °C)

III. Färbemethoden

a) Es wurde hauptsächlich eine Baumwollblaufärbung nach POPP (23) angewendet, die für eine Schnittfärbung abgeändert werden konnte. Die Farblösung hatte folgende Zusammensetzung:

0,1 g Baumwollblau
12,5 g Milchsäure
62,5 g Aqua dest.
12,5 g Glyzerin
12,5 g Phenol (Schmelzpunkt: 45 bis 50 °C)

Gefriermikrotomschnitte (10 bis 30 μ) wurden auf dem Objektträger in 10%iger Kalilauge vorsichtig bis zum Sieden erhitzt. Nach der anschließenden gründlichen Wasserabspülung erfolgte die Färbung durch kurzes Aufkochen (2 Minuten) in der Baumwollblaulösung. Die Untersuchung der Schnitte wurde entweder in Wasser oder in Glyzerin vorgenommen.

In den gefärbten Präparaten erscheinen die Hyphen dunkelblau neben den helleren Zellwänden der Wirtspflanze. Diese Methode gestattet innerhalb kurzer Zeit die Bearbeitung einer größeren Anzahl von Pflanzen, läßt allerdings Einzelheiten nicht genügend erkennen. Sie wurde daher vorwiegend angewendet, um einen allgemeinen Überblick über die Verteilung des Myzels im Wirtsgewebe zu erhalten.

b) Für genauere Untersuchungen wurden Paraffinschnitte bis zu 10 μ Dicke hergestellt.

Die Fixierung der Objekte erfolgte entweder in einem Gemisch aus gleichen Teilen Alkohol abs. und Eisessig (nach WOOLMAN 32) mit anschließender Überführung in Alkohol abs., Chloroform und dann in Paraffin (Schmelzpunkt: 56 °C) oder in einem Fixiergemisch nach CRAF, das von RANDOLPH (24) zusammen mit einem Paraffin-Einbettungsverfahren beschrieben worden ist.

Die Färbung der Paraffinschnitte wurde nach der von WOOLMAN (32) angegebenen GRAMschen Methode durchgeführt, bei der Lösungen nach Angaben von SCHÖMMER (27) verwendet wurden. In den meisten Fällen wurde eine Gegenfärbung mit einer Orange-G-Lösung (0,2 %) vorgenommen. Als Einschlußmedium eignete sich Kanadabalsam gut.

In den fertigen Präparaten ist der plasmatische Inhalt der Hyphen intensiv violett gefärbt, während Zellwände und Kerne des Wirtsgewebes weniger stark hervortreten.

Die Zeichnungen wurden mit einem Zeiß-Winkel-Zeichenapparat angefertigt.

C. Anlage der Versuche

Die Entwicklung des Steinbrandes von der Inokulation der Keimlinge bis zur Sporenbildung in den Ähren läßt sich in mehrere Abschnitte unterteilen. In der ersten Phase wird das Infektionsmyzel auf der Koleoptile ausgebildet. Die zweite umfaßt den Weg der Hyphen vom Eindringen in das

Tabelle 1

Allgemeine Übersicht über Versuchsanlage und Steinbrandbefall (in Prozent) bei der Reife

Steinbrand	Wirtspflanze und Anfälligkeit gegen die betreffende Steinbrandart	Aufstellung der Versuche in Kühlzellen von:					
		3 °C 30 Tage		3 °C 16 T. 15 °C 14 T.	15 °C 14 Tage		
		Sporidieninokulation an Keimlingen					Sporen-inokulation an Körnern
		unverletzt	verletzt	verletzt	unverletzt	verletzt	
Vorversuche 1956							
Zwergsteinbrand	Winterweizen General v. Stocken (anfällig)	11	73				
Hauptversuche 1957							
Zwergsteinbrand	Winterweizen Ackermanns Herold (anfällig)	Serie 1 45	Serie 2 63	Serie 3 24		Serie 4 3	
Zwergsteinbrand	Winterweizen Wasatsch (resistent)		Serie 5 2				
Zwergsteinbrand	Winterroggen Petkuser Normalstroh (nicht anfällig)		Serie 6 7				
Roggensteinbrand	Winterroggen Petkuser Normalstroh (anfällig)	Serie 7 6	Serie 8 71				
gewöhnl. Steinbrand	Winterweizen Ackermanns Herold (anfällig)	Serie 9 54	Serie 10 76		Serie 11 77		Serie 12 93

Wirtsgewebe bis zum Erreichen des Vegetationskegels. In der dritten Phase erfolgt die weitere Ausbreitung des Parasiten in der sich streckenden Pflanze, und die vierte umschließt die Sporenbildung.

Das entscheidende Entwicklungsstadium des Pilzes bildet die zweite Phase. Nur vom Vegetationskegel aus kann das Myzel dem weiteren Wachstum der Wirtspflanze folgen, um an den einzigen Ort, an dem die Sporenbildung möglich ist, die Ährchen, zu gelangen. Beim Zurückbleiben in den Blättern dagegen kann es höchstens einen latenten Befall erzielen.

Diese einzelnen Stadien wurden getrennt untersucht. Es ergaben sich dabei folgende Fragen:

Zu 1. Welchen Einfluß haben verschiedene Temperaturen auf die Ausbildung des Infektionsmyzels auf der Koleoptile?

Zu 2. Wie verläuft das Eindringen des Parasiten in die Wirtspflanze: in unverletzten und verletzten Keimlingen, unter verschiedener Temperatureinwirkung, in anfälligen und resistenten Wirtssorten? Ergeben sich Unterschiede bei den einzelnen Steinbrandarten?

Zu 3. Auf welche Weise breitet sich das Myzel in der Ährenanlage weiter aus, und wie kann es mit dem Streckungswachstum der Pflanze Schritt halten? Läßt sich in den vegetativen Teilen der reifen Pflanze noch Pilzmyzel nachweisen, und können Anhaltspunkte für die Erklärung des Zwergwuchses gewonnen werden?

Zu 4. Wie erfolgt die Sporenbildung? Welche Unterschiede bestehen in der Ausbildung von Vollbrandbutten und partialbefallenen Körnern?

Zur Klärung dieser Fragen wurden verschiedene Versuche mit Zwergsteinbrand, Roggensteinbrand und dem gewöhnlichen Steinbrand angelegt. In Tabelle 1 sind die einzelnen Versuchsserien, ihre Aufstellung während der ersten 30 Tage nach der Inokulation und der Befall bei der Reife am 27. 7. 1957 eingetragen. Sie soll eine vergleichende Übersicht geben, wie die Erkrankung durch die verschiedenen Umweltbedingungen beeinflußt wird.

D. Ergebnisse der anatomischen Untersuchungen

An den Anfang der Serienuntersuchungen wurden kleinere Versuche gestellt, um die ersten Entwicklungsstadien des Steinbrandmyzels nach der Inokulation der Keimlinge zu beobachten.

I. Ausbildung des Infektionsmyzels auf der Koleoptile

Nach FISCHER und HOLTON (8) werden die Infektionshyphen zum größten Teil aus haploiden, fusionierenden Sporidien gebildet. Nur dieses dikaryotische Myzel ist in der Lage, in die Wirtspflanze einzudringen. Außerdem können in wenigen Fällen einzelne Sporidien sofort zu haploiden Hyphen auswachsen, die nachträglich untereinander Fusionsbrücken ausbilden. Nach HOLTON (14) ist das haploide Zwergsteinbrandmyzel fein verzweigt, während das dikaryotische ein stärkeres Längenwachstum zeigt. In

den folgenden Versuchen wurden die Kernverhältnisse nicht berücksichtigt. Es konnte daher, nur auf Grund des äußeren Bildes, kein Unterschied in der Ausbildung der Hyphen festgestellt werden.

Für die Untersuchung wurde die Epidermis der Koleoptile abgezogen und ungefärbt unter dem Mikroskop betrachtet.

1. Unterscheidung des Steinbrandes von anderen Pilzen

Vor Beginn der Untersuchungen war zu prüfen, auf welche Weise sich der Steinbrand von anderen Pilzmyzelien unterscheiden läßt. Vergleiche von inokulierten und nicht inokulierten bzw. eindeutig mit *Fusarium* und *Septoria* befallenen Keimlingen ergaben folgendes Bild: der Steinbrand bildet nach der Inokulation auf der Koleoptile lange, feine Hyphenstränge von höchstens 3 μ Breite aus, die wenig verzweigt und deren Septierungen undeutlich zu erkennen sind. Die älteren Teile verlieren schnell ihren plasmatischen Inhalt und werden teilweise wieder aufgelöst.

Durch diese Art des Wachstums läßt sich das Steinbrandmyzel in den meisten Fällen von den Hyphen anderer Pilze trennen, die sich entweder verzweigter oder knorriger entwickeln und deren Septierungen deutlicher ausgebildet sind. In Abbildung 1 a ist der Zwergsteinbrand neben zwei anderen auf der Koleoptile von Getreidekeimlingen häufig vorkommenden Pilzen, *Septoria nodorum* Berk. (b) und *Fusarium* sp. (c), dargestellt.

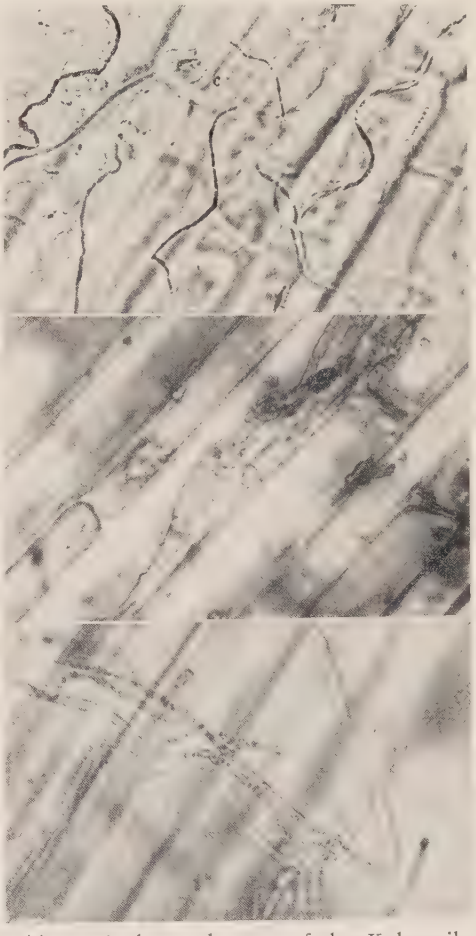


Abb. 1. Hyphenwachstum auf der Koleoptile. a *Tilletia contraversa*, b *Septoria nodorum*, c *Fusarium* sp. Vergrößerung 415fach

2. Entwicklung der Infektionshyphen beim Zwergsteinbrand

Versuche bei infektionsgünstiger Temperatur von etwa 3 °C zeigten, daß schon am ersten Tage nach der Inokulation die Sporidien zu Hyphen ausgewachsen waren (Abb. 2). In den meisten Fällen entstanden sie an der einen der beiden fusionierenden Primärsporidien entweder durch Auswachsen der Sporidienspitze (a) oder durch seitliche Abzweigung (b). Sekundärsporidien wurden selten entwickelt (c). Das Plasma wanderte in die neugebildete

Hyphenspitze ein, während der leere ältere Teil durch ein Septum abgetrennt wurde (Abb. 3). Das Myzel breitete sich sehr schnell auf der Koleoptile aus, begann ungefähr vom 6. Tage an in die Epidermis einzudringen und war nach drei bis vier Wochen bis auf einzelne leere Hyphenstränge vollkommen aufgelöst.

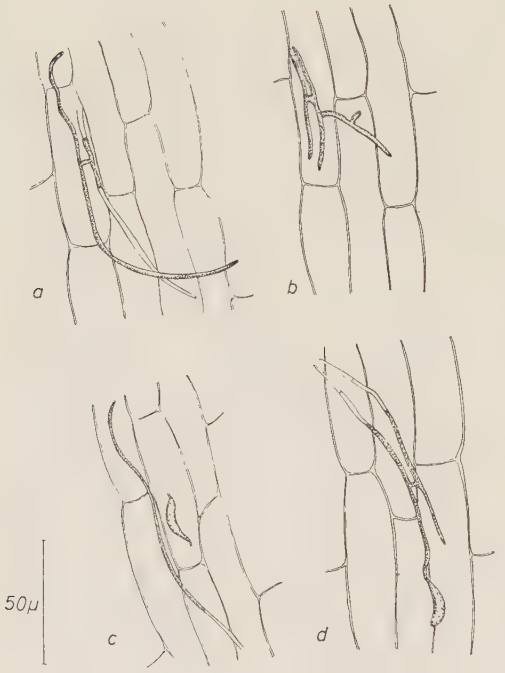


Abb. 2. Sporidien auf der Koleoptile.
a und b Primärsporidien des Zwergsteinbrandes, c Hyphe und Sekundärsporidie des Zwergsteinbrandes, d Primär- und Sekundärsporidie des Roggensteinbrandes.
Nicht ausgefüllt = ältere Hyphenteile, ausgefüllt = jüngere Hyphen

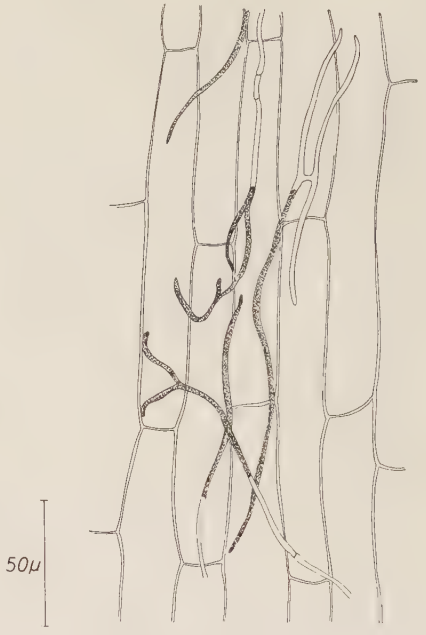


Abb. 3. Hyphenentwicklung des Zwergsteinbrandes auf der Koleoptile.
Nicht ausgefüllt = ältere Hyphenteile, ausgefüllt = jüngere Hyphen

Bei höherer Temperatur von etwa 15 °C wurden nur einzelne Hyphen entwickelt, deren plasmatischer Inhalt zum größten Teil tröpfchenförmiges Aussehen hatte. Die meisten Sporidien lösten sich schon nach wenigen Tagen auf, ohne vorher Myzel gebildet zu haben. Bereits am 10. Tage nach der Inokulation waren fast keine Hyphen mehr auf der Koleoptile zu finden.

3. Vergleich mit Roggensteinbrand und dem gewöhnlichen Steinbrand

Untersuchungen am Roggensteinbrand und dem gewöhnlichen Steinbrand ließen erkennen, daß auch diese Arten das feinstrukturierte Myzelwachstum des Zwergsteinbrandes haben. Während die Ausbildung der Roggensteinbrandhyphen ähnlich wie beim Zwergsteinbrand verlief — die Entwicklung wurde ebenfalls bei höherer Temperatur gehemmt —, verhielt sich der gewöhnliche Steinbrand anders. Die Hyphen entstanden in den meisten

Fällen nicht direkt aus den fusionierenden Primärsporidien, sondern aus den Sekundärsporidien. Bei tiefer (3 °C) sowie bei höherer Temperatur (15 °C) wurde das Myzel normal ausgebildet und erst nach drei bis vier Wochen aufgelöst.

II. Vordringen des Steinbrandes zum Vegetationskegel

Auch innerhalb der Wirtspflanze läßt sich der Steinbrand deutlich von anderen Pilzhyphen unterscheiden. Untersuchungen an 10, 30, 60 und 100 Tage alten, nicht mit Steinbrand inokulierten Pflanzen zeigten, daß Fremdmyzel hauptsächlich in der Koleoptile, teilweise auch in den äußeren Blattgeweben, aber niemals in den inneren Blättern oder gar im Vegetationskegel vorkam. Es trat in den meisten Fällen lokalisiert auf, bestand zum größten Teil aus knorrigen, vielverzweigten Hyphen und füllte oft die Zellen vollständig aus. Es war vielfach ohne Färbung zu erkennen, ließ sich jedoch mit Baumwollblau kräftig anfärben.

Das Brandmyzel dagegen durchdringt nur die äußersten Zellschichten der Koleoptile intrazellular, besetzt auch dann nicht das ganze Zellumen, und breitet sich in seinem weiteren Verlauf in allen Geweben interzellular aus. Durch seine enge Anpassung an die Zellwände ist es ungefärbt nicht zu finden.

1. Zwergsteinbrand in anfälligen Weizenpflanzen

a) Versuche bei tiefer Temperatur

Serie 1
Sorte: „Ackermanns Herold".
Zustand der Pflanzen: unverletzt.
Aufstellung nach der Inokulation: 30 Tage bei 3 °C.

Tabelle 2

Zwergsteinbrand in unverletzten, anfälligen Wirtspflanzen bei tiefer Temperatur

Tag	Zahl der untersuchten Pflanzen	Pilzmyzel wurde festgestellt: intrazellular in der äußeren Koleoptile	interzellular in: Koleoptile	Blättern	Seitenknospen	Achse und Vegetationskegel
2.	30	0	0	0	0	0
4.	30	0	0	0	0	0
8.	30	20	0	0	0	0
16.	30	27	2	0	0	0
24.	30	30	4	0	0	0
30.	30	30	10	0	4	0
50.	20	20	20	3	3	3
257.	53*)	brandbefallene Pflanzen: 24 (= 45,3 %) davon teilbefallen: 3 (Haupttriebe gesund)				

*) Diese erste Serie wurde mit einer zu kleinen Pflanzenzahl angelegt. Das Ergebnis ist daher nicht genügend gesichert.

Von den einzelnen Entwicklungsstadien wurden Schnittreihen hergestellt (Längsschnitte vom Keimknoten bis zu einer Höhe von 3 mm), deren Ergebnisse in Tabelle 2 und in Abbildung 8 wiedergegeben sind.

Während in den ersten Tagen nach der Inokulation nur das beschriebene Infektionsmyzel auf der Koleoptile entwickelt wurde, begann der Pilz vom 8. Tage an in die Koleoptile einzudringen (Abb. 4 u. 5).

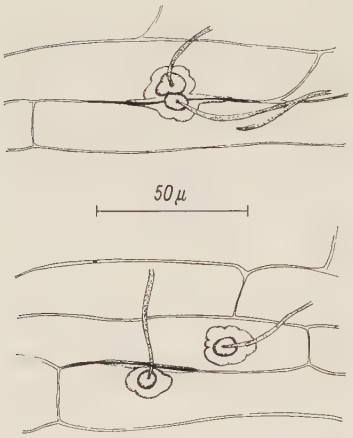


Abb. 4. Oberflächenansicht der Koleoptile: Eindringen von Zwergsteinbrandhyphen in die Epidermiszellen

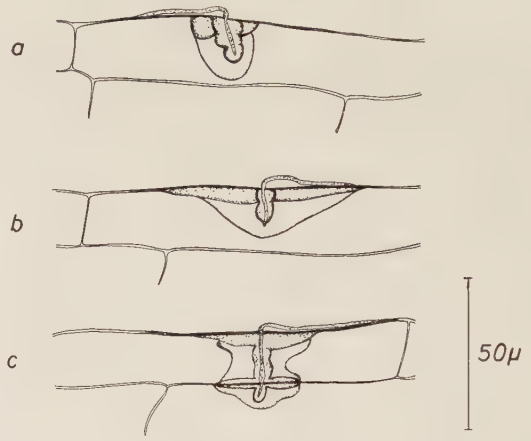


Abb. 5. Längsschnitte durch die Epidermis der Koleoptile: Eindringen von Zwergsteinbrandhyphen, Ausbildung der Umhüllungsscheiden.
a—c verschieden weit fortgeschrittene Stadien

Die ersten Anzeichen des Angriffs auf das Wirtsgewebe werden in einer Verdickung der Epidermiszellwand deutlich, die in diesem Stadium noch wenig kutinisiert ist. Die Hyphen durchbrechen sie unter sichtbarer Einschnürung und gelangen an das Zellumen (Abb. 5 a), oder sie dringen zwischen den Zellwänden ein. Hinter der Perforationsstelle erreichen sie wieder ihre normale Breite, während die durchbrochene Membran stärker anschwillt und ebenfalls eine Veränderung des Zytoplasmas um die eingedrungenen Hyphen zu erkennen ist. Es ballt sich zusammen und bildet mit der verdickten Epidermiswand eine Hülle um den Pilz.

In dieser polsterartigen Anschwellung ist mit Jod-Jodkalium und Chlorzinkjod nach SCHAEDE (25) die Zellulose der Zellwand nicht mehr nachzuweisen. Auch die Plasmazusammenballung läßt sich durch Kalilauge (10 %) nicht auflösen. Zellwand und Zytoplasma sind also um den eingedrungenen Parasiten miteinander zu einer Scheide verbacken. Sie werden auffällig stark von basischen Farbstoffen angefärbt.

Die Bezeichnung „Lignintuber“[1]), wie sie in der Literatur für andere Pilze angegeben wird (FELLOWS 7, GÄUMANN 9, SCHMIEDEKNECHT 26), kann in diesem Fall nicht angewendet werden, da mit Phloroglucin (5%ige alkohol. Lösung) kein Lignin nachgewiesen werden konnte.

[1]) GÄUMANN verwendet den Ausdruck „Lignituber“.

Um diese Scheidenbildung zu durchbrechen, brauchte der Pilz mehrere Tage. In 16 Tage alten Keimlingen war das Stadium vom 8. Tage nur unwesentlich verändert (Abb. 8 d). Die Infektionshyphen waren zwar in fast alle untersuchten Pflanzen eingedrungen, aber nur wenige hatten die Umhüllungsscheiden bereits durchbrochen (Abb. 5 b) und die zweite Zellschicht erreicht (5 c). Auch beim Durchdringen der Epidermisinnenwand schwoll diese wieder an, jedoch nicht in dem Maße wie die Außenmembran.

Der Kern der Wirtszelle ist zuweilen in der Nähe der intrazellularen Hyphen zu finden. GÄUMANN (9) gibt für *Puccinia graminis tritici* Erikss. an, daß der Kern in manchen Fällen der eindringenden Hyphe entgegenwandert, sich an sie anlegt und anschwillt. Beim Zwergsteinbrand konnten ähnliche Beobachtungen nicht gemacht werden[1]).

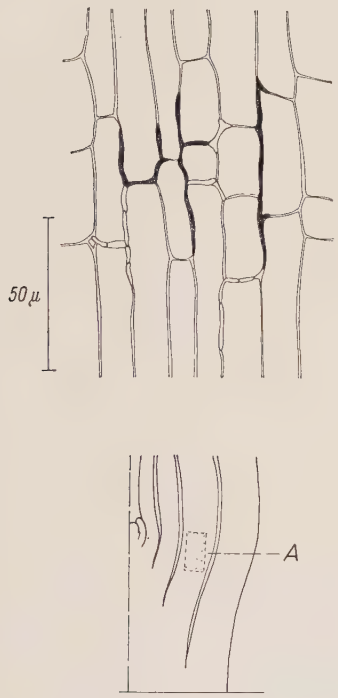


Abb. 6. Längsschnitt durch das äußere Blatt eines 24 Tage alten Weizenkeimlings: Interzellulares Wachstum der Zwergsteinbrandhyphen.
Nicht ausgefüllt = ältere Hyphenteile, ausgefüllt = jüngere Hyphen. Unten: Schematische Darstellung des Schnittes. A = Ausschnitt der histologischen Zeichnung

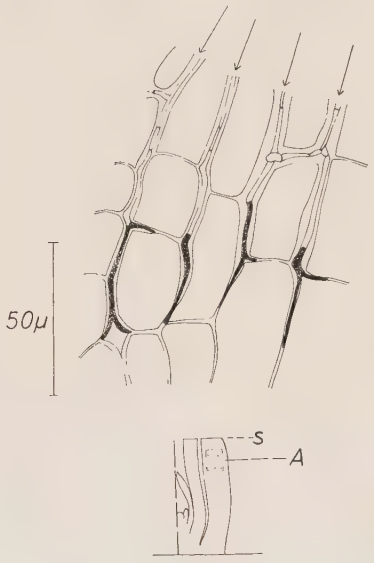


Abb. 7. Längsschnitt durch die Koleoptile eines vier Tage alten Weizenkeimlings: Interzellulares Vordringen der Zwergsteinbrandhyphen von der Schnittfläche aus.
Nicht ausgefüllt = ältere Hyphenteile, ausgefüllt = jüngere Hyphen. Unten: Schematische Darstellung des Schnittes. S = Schnittfläche, A = Ausschnitt der histologischen Zeichnung

1) In der Zeichnung sind die Zellkerne nicht mit eingetragen. Sie wurde nach Schnitten angefertigt, die nach der Baumwollblaumethode gefärbt waren, bei der Zellkerne und Zytoplasma durch die Einwirkung von Kalilauge herausgelöst sind.

Die weitere Ausbreitung des Myzels nach diesem intrazellularen Eindringen bis etwa in die dritte bis vierte Zellschicht der Koleoptile verlief in allen vegetativen Geweben der Wirtspflanze interzellular. Die älteren Hyphenteile wurden schon nach kurzer Zeit plasmaleer und ließen sich nur noch schwer anfärben (Abb. 6). Während am 24. Tage lediglich vereinzelt Myzelstränge in den inneren Zellagen der Koleoptile zu finden waren (Abb. 8 e), hatte sich der Parasit am 30. Tage bei einer großen Anzahl der untersuchten Pflanzen in ihren Geweben ausgebreitet und war teilweise bis zur äußersten Seitenknospe vorgedrungen (Abb. 8 f). Damit war bereits in diesem Stadium die Voraussetzung für einen Teilbefall geschaffen. Die weitere Besiedelung der Blätter erfolgte nur bei wenigen Pflanzen (Abb. 8 g), während bei dem Hauptanteil die eingedrungenen Hyphen auch am 50. Tage nicht über die Koleoptile hinausgelangt waren.

Im Gegensatz zu diesem Ergebnis steht der unerwartet hohe Befall bei der Reife. Die Vorversuche aus dem Jahre 1956 mit dem Winterweizen „General von Stocken" ergaben dagegen mit unverletzten Pflanzen einen weitaus niedrigeren Wert von 11 %, der etwa größenordnungsmäßig mit den unter gleichen Versuchsbedingungen erzielten Ergebnissen von NIEMANN (20) übereinstimmt. Hierbei ist zu berücksichtigen, daß in Serie 1 die Anzahl der geschnittenen Pflanzen wie die der später ausgewerteten zu gering ist, um die Ergebnisse vergleichen zu können. Ob allgemein die Sorte „Ackermanns Herold" in unverletztem Zustande gegen Zwergsteinbrand anfälliger ist als „General von Stocken", ist fraglich und bedarf weiterer Überprüfung.

Serie 2

Sorte: „Ackermanns Herold".
Zustand der Pflanzen: verletzt durch Abschneiden der Koleoptilenspitze.
Aufstellung nach der Inokulation: 30 Tage bei 3 °C.

Tabelle 3

Zwergsteinbrand in verletzten, anfälligen Wirtspflanzen bei tiefer Temperatur

Tag	Zahl der untersuchten Pflanzen	Pilzmyzel wurde festgestellt: intrazellular in: äußerer Koleoptile	Basis der Blätter	interzellular in: Schnittfläche	Koleoptile	Blättern	Seitenknospen	Achse u. Vegetationskegel
2.	30	0	0	10	0	0	0	0
4.	30	0	2	20	20	20	0	0
8.	30	9	6	17	17	17	0	0
16.	30	30	7	entwachsen	4	4	4	0
24.	30	30	9	entwachsen	10	4	4	0
30.	30	30	14	entwachsen	14	7	7	3
50.	20	20	15	entwachsen	15	10	10	10
250.	267	brandbefallene Pflanzen: 167 (= 62,5 %)						

Durch die Verletzung der Keimlinge sind dem Parasiten mehrere Wege gegeben, den Wirt zu befallen. Schon vom 2. Tage an begannen die Hyphen von der Schnittfläche aus interzellular in das Gewebe und gleichzeitig in die Blattzwischenräume einzudringen (Abb. 9 a). Es war dabei auffällig, daß sich die Zellwände um leere, ältere Hyphenteile verdickten, in der Umgebung des lebenden Myzels aber ihre normale Breite behielten (Abb. 7). Am 8. Tage war der Pilz bereits zwischen den Blättern bis zu deren Basis herabgewachsen und versuchte, von dort in das Gewebe vorzustoßen, während er innerhalb der Blätter fast die Höhe des Vegetationskegels erreicht hatte (Abb. 9 c). Ein zunächst überraschendes Bild ergab das Stadium am 16. Tage. Es waren bis zu einer Höhe von 4 mm über dem Keimknoten nur wenige Hyphen in der Wirtspflanze zu finden (Abb. 9 d). Die Pflanzen hatten zu diesem Zeitpunkt eine Länge von etwa 35 mm gegenüber 15 mm am 8. Tage und wiesen die größte Myzeldichte in den Blattspitzen auf. Der Pilz war mit dem Wachstum der Pflanze in den Blättern und in der Koleoptile hochgetragen worden und hatte so keine Möglichkeit mehr, zum Vegetationskegel zu gelangen. Nur die Außenepidermis der Koleoptile zeigte die schon bei Serie 1 beschriebenen Eintrittsstellen. Außerdem befanden sich in den Blattzwischenräumen viele Hyphenstränge, die an deren Basis in das Blattgewebe eingedrungen waren. Sie breiteten sich in den folgenden Stadien in den embryonalen Zonen der Sproßachse, der Blattanlagen und der Seitenknospen sehr

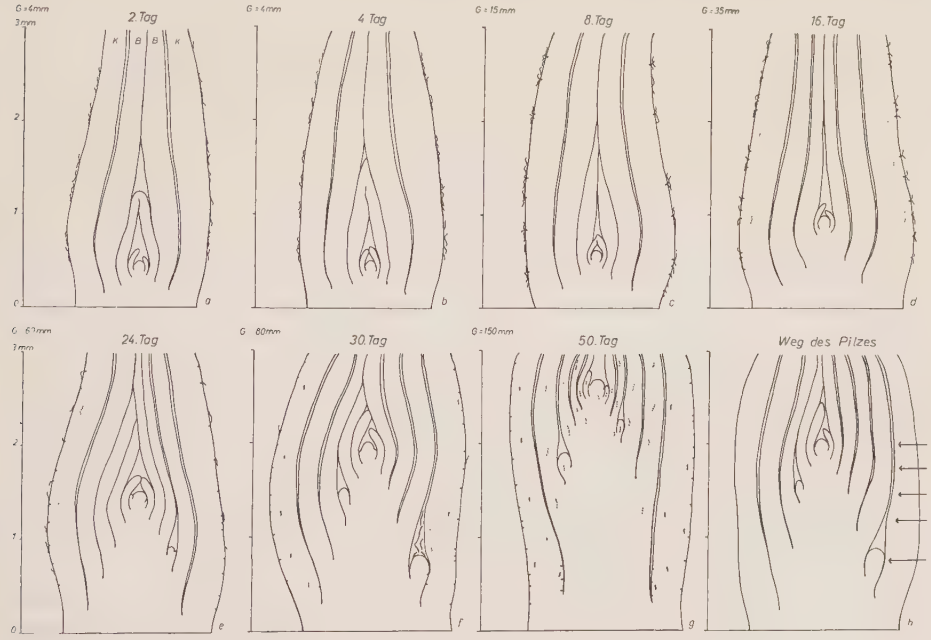


Abb. 8. Schematische Darstellung der Entwicklung des Zwergsteinbrandmyzels in unverletzt inokulierten Weizenpflanzen bei 3 °C (Serie 1) — Längsschnitte vom Keimknoten bis zu einer Höhe von 3 mm. G = Gesamtlänge der untersuchten Pflanzen, K = Koleoptile, B = Blätter. Ausgezogene Linie = häufiges; punktierte Linie = vereinzeltes Myzelvorkommen

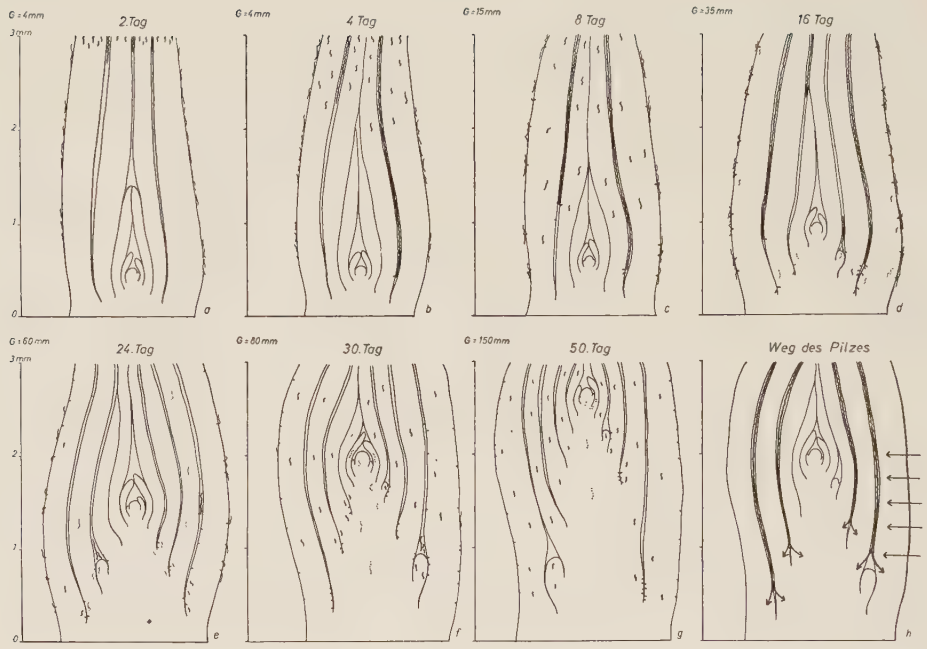


Abb. 9. Schematische Darstellung der Entwicklung des Zwergsteinbrandmyzels in verletzt inokulierten Weizenpflanzen bei 3 °C (Serie 2) — Längsschnitte vom Keimknoten bis zu einer Höhe von 3 mm. G = Gesamtlänge der untersuchten Pflanzen. Ausgezogene Linie = häufiges; punktierte Linie = vereinzeltes Myzelvorkommen

Abb. 10. Schematische Darstellung der Entwicklung des Zwergsteinbrandmyzels in verletzt inokulierten Weizenpflanzen bei 15 °C (Serie 4) — Längsschnitte vom Keimknoten bis zu einer Höhe von 5 mm. G = Gesamtlänge der untersuchten Pflanzen. Ausgezogene Linie = häufiges; punktierte Linie = vereinzeltes Myzelvorkommen

schnell aus und wurden mit dem Wachstum der Pflanzen in den Zellschichten der Blätter verteilt (Abb. 9 e, f). Am 50. Tage war daher bei der Hälfte der untersuchten Pflanzen nicht nur in den äußeren Blättern, sondern auch in den tieferen Geweben bis zum Vegetationskegel Myzel zu finden (Abb. 9 g).

b) Versuche bei höherer Temperatur

In Kapitel I wurde gezeigt, daß die Hyphenentwicklung des Zwergsteinbrandes auf der Koleoptile bei einer höheren Temperatur erheblich langsamer und nur sehr spärlich einsetzte. Die folgenden Versuchsreihen ergaben, daß auch innerhalb der Wirtspflanze das Wachstum des Pilzes durch eine Temperaturerhöhung verzögert wird.

Serie 3
Sorte: „Ackermanns Herold".
Zustand der Pflanzen: verletzt durch Abschneiden der Koleoptilenspitze.
Aufstellung nach der Inokulation: 16 Tage bei 3 °C, anschließend 14 Tage bei 15 °C.

Tabelle 4

Zwergsteinbrand in verletzten, anfälligen Wirtspflanzen bei verschiedenen Temperaturen

Tag	Zahl der untersuchten Pflanzen	Pilzmyzel wurde festgestellt: intrazellular in: äußerer Koleoptile	intrazellular in: Basis der Blätter	interzellular in: Schnittfläche	interzellular in: Koleoptile	interzellular in: Blättern	interzellular in: Seitenknospen	interzellular in: Achse u. Vegetationskegel
16.	20	20	5	entwachsen	7	3	5	0
30.	20	20	9	entwachsen	10	6	8	6
165.	63	brandbefallene Pflanzen: 15 (= 23,8 %) davon teilbefallen: 2 (Haupttriebe gesund)						

Es wurden in dieser Serie nur zwei Stadien untersucht: am 16. Tage nach Abschluß der Kaltaufstellung und am 30. Tage nach Beendigung der anschließenden Warmaufstellung. Ähnlich wie in Serie 2 (Abb. 9 d) war der Pilz am 16. Tage an der Basis der Blätter in die Weizenpflanze eingedrungen und befand sich vereinzelt schon in den äußeren Blattgeweben. Am 30. Tage hatten die Pflanzen eine durchschnittliche Länge von 15 cm erreicht, der Vegetationskegel lag etwa 3 mm über dem Keimknoten. Die Hyphen waren von den genannten Eintrittsstellen aus in die embryonalen Zonen der Sproßachse, der Seitenknospen, der inneren Blätter und des Vegetationskegels gelangt. In den älteren Zellschichten der äußeren Blätter hatten sie sich nicht weiter ausgebreitet.

Serie 4
Sorte: „Ackermanns Herold".
Zustand der Pflanzen: verletzt durch Abschneiden der Koleoptilenspitze.
Aufstellung nach der Inokulation: 14 Tage bei 15 °C[1]).

1) Eine längere Aufstellung der Keimlinge bei dieser Temperatur war nicht möglich, da kein Licht zur Verfügung stand und die Pflanzen zu sehr vergeilten.

Die Hemmung des Pilzwachstums durch eine höhere Temperatur wird deutlicher in dieser Serie, in der die Keimlinge sofort nach der Inokulation bei 15 °C aufgestellt wurden.

Tabelle 5

Zwergsteinbrand in verletzten, anfälligen Wirtspflanzen bei höherer Temperatur

Tag	Zahl der untersuchten Pflanzen	Pilzmyzel wurde festgestellt: intrazellular in: äußerer Koleoptile	Basis der Blätter	interzellular in: Schnittfläche	Koleoptile	Blättern	Seitenknospen	Achse u. Vegetationskegel
2.	20	0	0	8	0	0	0	0
4.	20	0	3	7	0	0	0	0
8.	20	10	3	entwachsen	0	0	0	0
16.	20	20	10	entwachsen	0	0	0	0
24.	20	20	10	entwachsen	1	0	0	0
30.	20	20	10	entwachsen	1	0	0	0
195.	137	brandbefallene Pflanzen: 4 (= 2,9 %)						

Das erste Stadium am 2. Tage ergab das gleiche Bild, wie in Serie 2 beschrieben (Abb. 10 a). Die Hyphen waren ebenfalls interzellular in die Schnittfläche und zwischen die Blätter eingedrungen. Aber schon am 4. Tage war das Myzel in den Blattgeweben mit dem schnellen Wachstum der Wirtspflanze so hoch getragen — es war von der Schnittfläche aus nur etwa 1 mm tief in den Blättern zu finden —, daß es den Vegetationskegel nicht mehr erreichen konnte (Abb. 10 b). Auch von den Eindringungspunkten an der Basis der Blätter und in der Koleoptile gelang es dem Parasiten in den folgenden Stadien nicht, sich in der Pflanze weiter auszubreiten. Die Differenzierung des Wirtsgewebes verlief durch die Einwirkung der höheren Temperatur in so kurzer Zeit (Abb. 10 c, d), daß es von den Infektionshyphen nicht mehr durchdrungen werden konnte. Obgleich die Weizenpflanzen durch zwei Wochen Dunkelaufstellung bei 15 °C sehr geschwächt waren (noch bei der Reife war der Pflanzenwuchs dieser Serie schwächer als in den anderen Versuchen), konnte der Pilz nur in Ausnahmefällen eine Infektion bewirken.

Die Ergebnisse dieser Versuchsserien zeigen, daß der Zwergsteinbrand selbst bei infektionsgünstigen tiefen Temperaturen sehr langsam und nur in embryonalen Geweben der Wirtspflanze vordringen kann. Der Weg durch die unversehrte Koleoptile ist daher zu lang (Serie 1, Abb. 8 h). Durch eine Verletzung der Keimlinge hingegen (Serie 2) ist der Pilz in der Lage, in wenigen Tagen zwischen den Blättern abwärts zu wachsen und an deren Basis einzudringen (Abb. 9 h). Dadurch ist nicht nur der Weg verkürzt, sondern er führt außerdem durch die leicht durchdringbaren embryonalen Zonen der Sproßachse.

Bei einer Temperaturerhöhung differenziert sich die Pflanze zu schnell heraus, während das Wachstum des Parasiten gehemmt wird. Er kann zwar oberflächlich ins Gewebe der Nährpflanze vorstoßen, hat aber nicht die Kraft, sich weiter darin auszubreiten (Serie 4). Eine Verletzung schafft nur dann günstige Bedingungen, wenn der Pilz zunächst bei tiefer Temperatur eindringen kann (Serie 3).

2. Zwergsteinbrand in nicht anfälligen Getreidearten

a) In Winterweizen

Serie 5
Sorte: „Wasatsch" (amerikanischer Winterweizen).
Zustand der Pflanzen: verletzt durch Abschneiden der Koleoptilenspitze.
Aufstellung nach der Inokulation: 30 Tage bei 3 °C.

Tabelle 6

Zwergsteinbrand in verletzten, resistenten Wirtspflanzen bei tiefer Temperatur

Tag	Zahl der untersuchten Pflanzen	Pilzmyzel wurde festgestellt: intrazellular in: äußerer Koleoptile	Basis der Blätter	interzellular in: Schnittfläche	Koleoptile	Blättern	Seitenknospen	Achse u. Vegetationskegel
2.	20	0	0	7	0	0	0	0
4.	20	0	0	8	0	0	0	0
8.	20	3	0	6	0	0	0	0
16.	20	10	2	entwachsen	3	1	1	0
30.	20	16	2	entwachsen	3	1	1	0
171.	136	brandbefallene Pflanzen: 3 (= 2,2 %) davon teilbefallen: 2 (Haupttriebe gesund)						

Am 2. Tage waren die Infektionshyphen bei einigen Pflanzen interzellular etwa 200 μ tief in die Schnittfläche und zwischen den Blättern und der Koleoptile eingedrungen. Dieses Stadium blieb unverändert in allen darauffolgenden Untersuchungen. Vom 8. Tage an begann der Pilz ebenfalls in die Außenepidermis der Koleoptile und vom 16. Tage an von der Basis der Blätter aus einzudringen. Es entstanden dabei die gleichen Verdickungen der Zellwände, wie in Serie 1 beschrieben. In späteren Stadien war nur vereinzelt in tieferen Blattgeweben Myzel zu finden, während der Hauptanteil die Umhüllungsscheiden der Epidermis nicht durchbrochen hatte.

b) In Winterroggen

Serie 6
Sorte: „Petkuser Normalstroh".
Zustand der Pflanzen: verletzt durch Abschneiden der Koleoptilenspitze.
Aufstellung nach der Inokulation: 30 Tage bei 3 °C.

Tabelle 7

Zwergsteinbrand in verletzten, nicht anfälligen Wirtspflanzen bei tiefer Temperatur

Tag	Zahl der untersuchten Pflanzen	Pilzmyzel wurde festgestellt:						
		intrazellular in:		interzellular in:				
		äußerer Koleoptile	Basis der Blätter	Schnittfläche	Koleoptile	Blättern	Seitenknospen	Achse u. Vegetationskegel
2.	20	0	0	10	0	0	0	0
4.	20	0	0	13	0	0	0	0
8.	20	3	0	15	0	0	0	0
16.	20	20	2	entwachsen	4	0	0	0
30.	20	20	3	entwachsen	8	2	2	0
145.	229	brandbefallene Pflanzen: 17 (= 7,4 %)						

Am 2. Tage war der Pilz wie in Serie 5 in das Wirtsgewebe eingedrungen. In den weiteren Entwicklungsstadien hatten die Hyphen zwar teilweise die Umhüllungsscheiden überwunden, aber nur selten war in den äußeren Blättern Myzel zu finden.

Als Ergebnis dieser Serien 5 und 6 ist festzustellen, daß es dem Zwergsteinbrand wohl gelingt, in nicht anfällige Wirtspflanzen einzudringen, daß er aber nicht in der Lage ist, sich weiter in den Geweben der Koleoptile und der Blätter zu entwickeln. Selbst von den Eintrittsstellen an der Basis der Blätter kann er sich nicht in den embryonalen Zonen der Sproßachse ausbreiten. Besondere Abkapselungen der Hyphen vom Wirt aus oder nekrotische Verfärbungen der Nährpflanze, wie es nach WESTERN (31) bei *Ustilago avenae* (Pers.) Rostr. und *Ustilago kolleri* Wells in resistenten Wirtspflanzen vorkommt, konnten nicht bemerkt werden.

3. Roggensteinbrand

Die folgenden Versuche mit Roggensteinbrand wurden in gleicher Weise wie beim Zwergsteinbrand durchgeführt. Als Wirtspflanze diente der Winterroggen „Petkuser Normalstroh". In Serie 7 wurden die Keimlinge unverletzt, in Serie 8 verletzt (durch Abschneiden der Koleoptilenspitze) inokuliert. Die Pflanzen wurden die ersten 30 Tage nach der Inokulation bei 3 °C aufgestellt.

Die mikroskopischen Untersuchungen ergaben in allen Einzelheiten das gleiche Bild wie beim Zwergsteinbrand in den entsprechenden Serien 1 und 2. Die Ergebnisse werden deshalb nur kurz zusammengefaßt.

In unverletzten Pflanzen: vom 8. Tage an Eindringen in die Epidermis der Koleoptile, Ausbildung der Umhüllungsscheiden, am 16. und 24. Tage vereinzelt Hyphen in der Koleoptile oder den äußeren Blattgeweben, am 30. Tage in wenigen Pflanzen Myzel in den Seitenknospen.

In verletzten Pflanzen: hauptsächliches Vordringen des Pilzes von der Schnittfläche aus zwischen den Blättern abwärts, von den Eintrittsstellen

an der Basis der Blätter Ausbreitung der Hyphen im Wirtsgewebe, am 30. Tage bei der Hälfte der untersuchten Pflanzen Myzel im Vegetationskegel.

Wie beim Zwergsteinbrand werden nur die äußersten Koleoptilenschichten intrazellular durchdrungen, während die weitere Ausbreitung interzellular verläuft. Im Gegensatz zum Zwergsteinbrand ist das Roggensteinbrandmyzel weitaus häufiger in allen Gewebeteilen zu finden.

Diese Serien mit dem Roggensteinbrand ergeben, daß, ähnlich wie beim Zwergsteinbrand, der Weg durch die unverletzte Koleoptile nur selten zur Infektion führt, da die Hyphen dem Wachstum der Pflanze nicht folgen können. Eine Verletzung hingegen erleichtert dem Parasiten das Erreichen des Vegetationskegels. Dies wird auch im Befall deutlich, denn bei der Reife wurden in unverletzten Pflanzen nur 6 %, in verletzten jedoch 71 % brandkranke Pflanzen gefunden.

4. Gewöhnlicher Steinbrand

Die Serien mit dem gewöhnlichen Steinbrand bei verschiedenen Temperaturen ergaben ein vom Zwergsteinbrand und Roggensteinbrand abweichendes Bild.

a) Versuche bei tiefer Temperatur

Serie 9
Sorte: Winterweizen „Ackermanns Herold".
Zustand der Pflanzen: unverletzt.
Aufstellung nach der Inokulation: 30 Tage bei 3 °C.

Tabelle 8

Gewöhnlicher Steinbrand in unverletzten, anfälligen Wirtspflanzen bei tiefer Temperatur

Tag	Zahl der untersuchten Pflanzen	Pilzmyzel wurde festgestellt:				
		intrazellular in der äußeren Koleoptile	interzellular in:			
			Koleoptile	Blättern	Seitenknospen	Achse und Vegetationskegel
2.	20	0	0	0	0	0
4.	20	3	0	0	0	0
8.	20	10	9	0	0	0
16.	20	20	17	0	0	0
24.	20	20	18	0	3	0
30.	20	20	15	1	4	0
50.	20	20	20	7	6	6
172.	140	brandbefallene Pflanzen: 80 (= 53,7 %) davon teilbefallen: 1 (Haupttrieb gesund)				

Schon am 2. Tage hatte sich ein großes Hyphennetz auf der Koleoptile entwickelt, das vom 4. Tage an in die Epidermis einzudringen begann. Es entstanden dabei die gleichen Umhüllungsscheiden des Wirtsgewebes wie beim Zwergsteinbrand. Am 8. Tage und in verstärktem Maße am 16. Tage

hatten die Hyphen diese Scheiden durchdrungen und befanden sich interzellular in der Koleoptile. In den weiteren Stadien, am 24. und 30. Tage, war in den Blättern der Wirtspflanze noch kein Myzel zu finden. Es hatte sich lediglich stärker in der Koleoptile ausgebreitet und vereinzelt die äußeren Seitenknospen erreicht. Nach dieser zögernden Entwicklung hatte der Pilz am 50. Tage bei einer größeren Anzahl von Pflanzen die Blattgewebe durchdrungen und befand sich in der Basis des Vegetationskegels.

Serie 10
Sorte: „Ackermanns Herold".
Zustand der Pflanzen: verletzt durch Abschneiden der Koleoptilenspitze.
Aufstellung nach der Inokulation: 30 Tage bei 3 °C.

Tabelle 9

Gewöhnlicher Steinbrand in verletzten, anfälligen Wirtspflanzen bei tiefer Temperatur

Tag	Zahl der untersuchten Pflanzen	Pilzmyzel wurde festgestellt: intrazellular in: äußerer Koleoptile	Basis der Blätter	interzellular in: Schnittfläche	Koleoptile	Blättern	Seitenknospen	Achse u. Vegetationskegel
2.	20	0	0	6	0	0	0	0
4.	20	0	0	10	10	10	0	0
8.	20	10	3	17	17	17	0	0
16.	20	20	10	entwachsen	5	1	4	0
24.	20	20	5	entwachsen	10	4	6	4
30.	20	20	11	entwachsen	10	8	8	8
129.	75	brandbefallene Pflanzen: 57 (= 76 %) davon teilbefallen: 4 (Haupttriebe gesund oder partialbefallen)						

Der Weg des Pilzes zum Vegetationskegel verlief in dieser Serie ebenso wie in den entsprechenden Versuchen beim Zwergsteinbrand (Serie 2) und Roggensteinbrand (Serie 8): Eindringen von der Schnittfläche aus interzellular in das Wirtsgewebe, in die Blattzwischenräume und in die Außenepidermis der Koleoptile; am 16. Tage nur vereinzelt Hyphen in den Blattgeweben, der Hauptanteil war mit dem Wachstum der Pflanze in höhere Blattschichten gelangt; am Grunde der Blätter Eintrittsstellen, von denen sich der Pilz im Wirtsgewebe ausbreitete; am 30. Tage Myzel bei 8 von 20 untersuchten Pflanzen in der Sproßachse, den inneren Blättern, den Seitenknospen und dem Vegetationskegel.

b) Versuche bei höherer Temperatur

Serie 11
Sorte: „Ackermanns Herold".
Zustand der Pflanzen: unverletzt.
Aufstellung nach der Inokulation: 14 Tage bei 15 °C.

Tabelle 10
Gewöhnlicher Steinbrand in unverletzten, anfälligen Wirtspflanzen bei höherer Temperatur

Tag	Zahl der untersuchten Pflanzen	Pilzmyzel wurde festgestellt: intrazellular in der äußeren Koleoptile	interzellular in: Koleoptile	Blättern	Seitenknospen	Achse und Vegetationskegel
2.	20	0	0	0	0	0
4.	20	6	0	0	0	0
8.	20	20	10	0	0	0
16.	20	20	7	0	2	0
24.	20	20	10	0	2	0
30.	20	20	20	5	7	0
50.	20	20	20	20	20	10
179.	166	brandbefallene Pflanzen: 127 (= 76,5 %)				

Die Entwicklung des Infektionsmyzels auf der Koleoptile und in der Nährpflanze zeigte bei 3 °C und bei 15 °C keine wesentlichen Unterschiede. Vom 4. Tage an begann der Pilz in die Pflanze einzudringen. Es wurden die gleichen Scheiden wie in den Versuchen vorher gebildet. In den nächsten Stadien am 8. und 16. Tage war ein verstärkter Befall der Epidermis zu bemerken, während am 24. und 30. Tage die weitere Ausbreitung in der Koleoptile und in den äußeren Blättern der Wirtspflanze erfolgte. Am 50. Tage endlich waren die Hyphen in allen untersuchten Pflanzen in den Blättern, der Sproßachse und in den Seitenknospen zu finden, im Vegetationskegel jedoch war nur bei der Hälfte der Pflanzen Myzel anzutreffen.

Serie 12
Sorte: „Ackermanns Herold".
Körner mit Sporenpulver eingepudert.
Aufstellung nach der Inokulation: 14 Tage bei 15 °C.

Tabelle 11
Gewöhnlicher Steinbrand in unverletzten, anfälligen Wirtspflanzen bei höherer Temperatur

Tag	Zahl der untersuchten Pflanzen	Pilzmyzel wurde festgestellt: intrazellular in der äußeren Koleoptile	interzellular in: Koleoptile	Blättern	Seitenknospen	Achse und Vegetationskegel
8.	20	13	3	0	0	0
16.	20	20	1	0	0	0
24.	20	20	5	0	0	0
30.	20	20	15	0	5	0
50	20	20	15	15	15	13
158.	197	brandbefallene Pflanzen: 183 (= 92,9 %)				

Der stärkste Infektionserfolg wurde in dieser Serie erreicht, bei der ungekeimte Sporen als Inokulationsmaterial verwendet wurden. Die Hyphenentwicklung auf der Koleoptile begann erst am 4. Tage. Das Eindringen und die weitere Ausbreitung im Wirtsgewebe verlief wie in den Serien 9 und 11. Es wird deshalb auf die Einzelheiten nicht weiter eingegangen.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß der gewöhnliche Steinbrand bei tiefen Temperaturen in unverletzte sowie in verletzte Keimlinge eindringen und sich darin weiter ausbreiten kann. Während er in verletzten Pflanzen durch die Verkürzung des Infektionsweges zum Vegetationskegel schon nach 30 Tagen sein Ziel erreicht hat, erfolgt die Besiedelung der unverletzten Keimlinge langsamer. Die Hyphen sind erst nach ungefähr 50 Tagen in den Geweben der Sproßachse und des Vegetationskegels zu finden.

Im Gegensatz zum Zwerg- und Roggensteinbrand ist der gewöhnliche Steinbrand in der Lage, auch bei höherer Temperatur Infektionsmyzel auszubilden und sich in den Geweben der Pflanze zu entwickeln. Die Hyphen sind teilweise schon am 4. Tage nach der Inokulation in die Epidermis der Koleoptile eingedrungen und haben bereits am 8. Tage die Umhüllungsscheiden überwunden. Beide anderen Pilze können nur bei tiefer Temperatur aktiv wachsen, und auch dann sind sie in den tieferen Zellschichten der Koleoptile erst vom 16. Tage an zu finden. Für die Getreidepflanzen besteht daher die Möglichkeit, dem Zwerg- und Roggensteinbrand bei einer höheren Temperatur zu entwachsen, während der gewöhnliche Steinbrand mit der Entwicklung des Wirtsgewebes Schritt halten kann.

III. Weitere vegetative Ausbreitung in der Wirtspflanze

1. Beim Zwergsteinbrand

Die Entwicklung des Myzels bis zur Sporenbildung im Fruchtknotengewebe der Wirtspflanze wurde im einzelnen nur an der Serie 2 weiter verfolgt, da alle Versuche mit Ausnahme der ersten 30 Tage bis zur Reife gleich behandelt wurden. Die Untersuchungen ergaben folgendes Bild:

Die Weizenpflanzen entwickelten sich in den ersten Monaten nach der Aussaat von November bis März nur geringfügig. Der Vegetationskegel hatte während dieser Zeit halbkugelige Gestalt mit undifferenzierter, glatter Oberfläche. An seinem unteren Teil wurden die Blätter als kleine Höcker in akropetaler Reihenfolge mit den einzelnen Seitenknospen in ihren Achseln angelegt.

Nach 100 Tagen (Anfang März): Am Ende der vegetativen Periode hatten die Pflanzen eine durchschnittliche Länge von 17 cm, die Vegetationskegel eine solche von etwa 250 μ erreicht. Es waren im allgemeinen sieben Blätter zu unterscheiden, während die Koleoptile nur noch aus einem trockenen Häutchen bestand. In der Sproßachse waren schon die ältesten Knoten und die Anlage der jüngeren zu erkennen. In den Internodien wurden die Zellen frühzeitig in der Längsrichtung angeordnet, in den Nodien lagen sie fester zusammen. Die äußersten Seitentriebe (1 bis 2) hatten teilweise eine Länge bis zu 10 cm, ihre Vegetationskegel ungefähr bis 100 μ.

Der Pilz befand sich in diesem Stadium in der Basis des Hauptvegetationskegels, besonders in den Blättern und den Seitentrieben, weniger häufig in den Nodien und Internodien der Halmanlage (Abb. 11 a). Das Myzel bestand aus kleinen, interzellular wachsenden Hyphenstücken, die in den basalen Geweben teilweise plasmaleer und daher schwer anzufärben waren.

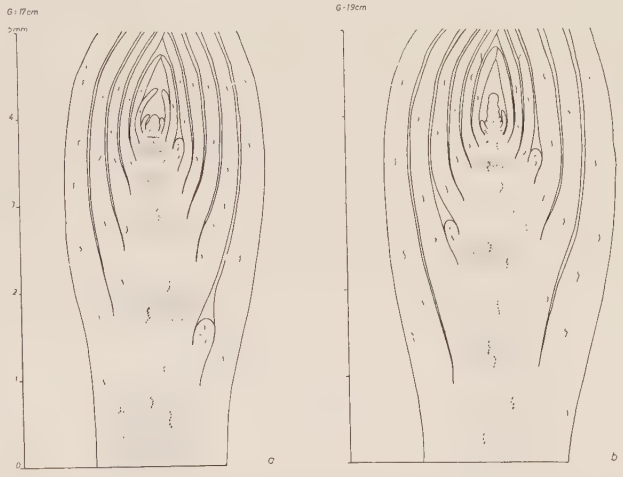


Abb. 11. Schematische Darstellung der Entwicklung des Zwergsteinbrandmyzels a) in 100, b) in 125 Tage alten Weizenpflanzen. Längsschnitte vom Keimknoten bis zu einer Höhe von 5 mm,

G = Gesamtlänge der untersuchten Pflanzen, ausgezogene Linie = häufiges; punktierte Linie = vereinzeltes Myzelvorkommen

Nach 125 Tagen (Ende März): Mit dem Ansteigen der Temperaturen und der Lichtmenge setzte ein stärkeres Wachstum der Wirtspflanzen ein. Der Vegetationskegel entwickelte sich zur Ährenanlage, er begann sich zu strecken, es entstanden an seinen Seiten kleine Vorwölbungen, die sich sehr schnell herausdifferenzierten.

Während sich das Myzel in diesen meristematischen Geweben der Weizenpflanze weiter ausbreitete (Abb. 11 b), hatte sich das Bild in den Blättern, den Seitenknospen und in der Sproßachse gegenüber dem vorhergehenden Stadium nur unwesentlich verändert.

Nach 145 Tagen (Mitte April): An der Ährenanlage bildeten sich die einzelnen Höcker heraus und entwickelten sich in den folgenden Wochen zu den Ährchen. Die Gesamtlänge der Pflanzen betrug im Durchschnitt 20 cm. Es waren im allgemeinen zwei Internodien von etwa 1 cm Länge und ein bis drei Seitentriebe äußerlich sichtbar.

Die Brandhyphen befanden sich hauptsächlich in der Basis des Ährengewebes und waren nur vereinzelt in der oberen Hälfte anzutreffen. In den übrigen Teilen der Pflanze kamen sie vorwiegend in den Blättern, den Seitenknospen und seltener in der Sproßachse vor.

Nach 165 Tagen (Anfang Mai): Zu diesem Zeitpunkt ließen sich deutlich zwei Gruppen von Pflanzen unterscheiden:

a) mit einer Länge bis zu 50 cm und höchstens zwei Seitentrieben,

b) mit einer Länge bis zu 28 cm und vier bis sechs Seitentrieben.

Die anatomischen Untersuchungen zeigten, daß nur die Pflanzen der Gruppe b befallen waren. Der Zwergsteinbrand hatte sich in diesen Pflan-

zen in den ganzen Ährenanlagen (Abb. 12 a) der Haupt- und Seitentriebe und in den noch wenig differenzierten Knoten unterhalb der Ähre interzellular ausgebreitet, war aber nur vereinzelt in den teilweise schon verhärteten Geweben der unteren Nodien und zwischen den langgestreckten Zellen der Internodien zu finden. Die Wirtszellen in der unmittelbaren Nähe der Hyphen hatten normales, gesundes Aussehen und zeigten an keiner Stelle eine krankhafte Veränderung durch das Pilzmyzel.

Abb. 12. Schematische Darstellung der Ausbreitung des Zwergsteinbrandmyzels.

a in der Ährenanlage von 165 Tage alten Weizenpflanzen, b in einem Ährchen von 200 Tage alten Weizenpflanzen.

1 = Hüllspelzen, 2 = Vorspelze, 3 = Deckspelze, 4 = Staubblatt, 5 = Fruchtknoten, 6 = Lodicula

Vergleichende Messungen gesunder und kranker Weizenhalme ergaben, daß in beiden Fällen die gleiche Knotenanzahl ausgebildet wurde, die Inter-

Tabelle 12

Verkürzung der befallenen Halme (in Prozent) im Vergleich zu gleich alten gesunden

	Datum	Durchschnittliche absolute Internodienlänge in cm							Gesamtlänge in cm	Zahl der untersuchten Halme
gesunde Halme	2. 5.	4,9	10,5	14,0	18,5	3,5	0,6	0,2	52,2	5
befallene Halme		4,4	5,0	3,5	1,4	0,5	0,2	0,1	15,1	15
Verkürzung der befallenen Halme bezogen auf die gesunden		10,2	52,4	75,0	92,4	85,7	66,7	50,0	71,1	
gesunde Halme	1. 6.	7,0	6,5	7,1	10,4	14,2	8,1	10,0	63,3	3
befallene Halme		3,7	3,6	4,5	5,4	6,6	4,0	3,2	31,0	8
Verkürzung der befallenen Halme bezogen auf die gesunden		47,1	44,6	36,6	48,1	53,5	50,6	68,0	51,0	

nodien der gesunden aber mehr gestreckt waren. Aus Tabelle 12 geht hervor, daß bei den erkrankten Pflanzen die mittleren Internodien am stärksten verkürzt waren. Da jedoch nur eine geringe Halmanzahl ausgewertet werden konnte, ist das Ergebnis nicht genügend gesichert.

Nach 200 Tagen (Anfang Juni): Mit dem weiteren Wachstum der Wirtspflanzen erfolgte die Differenzierung des Ährengewebes in die einzelnen Ährchen und die Streckung der Halme.

Der Pilz konnte mit dieser fortschreitenden Entwicklung der Nährpflanze in die neugebildeten Zellschichten der Ährchen vordringen. Er gelangte in alle Blütenteile: in die Spelzen, Lodiculae, Fruchtknoten und in die Staubblätter (Abb. 12 b). Während sich das Myzel dann nur im Fruchtknoten weiter ausbreitete und schließlich zur Sporenbildung überging (vgl. Abschnitt IV), wurde es in den übrigen Geweben der Ähre durch die Ausdifferenzierung der Zellen zerrissen und löste sich in den sklerenchymatischen Schichten teilweise auf.

In dem sich streckenden Halm waren die Pilzhyphen häufig in den jüngsten Knoten unterhalb der Ähre, weniger reichlich in den abgestorbenen basalen Pflanzenteilen zu finden. Sie wuchsen in den Interzellularen des Parenchyms, des Xylems und Phloëms und des Festigungsgewebes (Abb. 13 a). Oberhalb des Knotens kamen sie zum größten Teil an der Insertionsstelle der Blätter vor (b) und nur vereinzelt in den Knotenrandzonen und den inneren Geweben. Untersuchungen der anschließenden Internodien ließen erkennen, daß etwa bis zu 5 mm vom Knoten entfernt noch Hyphen anzutreffen waren (c), sie fehlten in den übrigen Teilen. Die unterschiedliche Ausbildung der

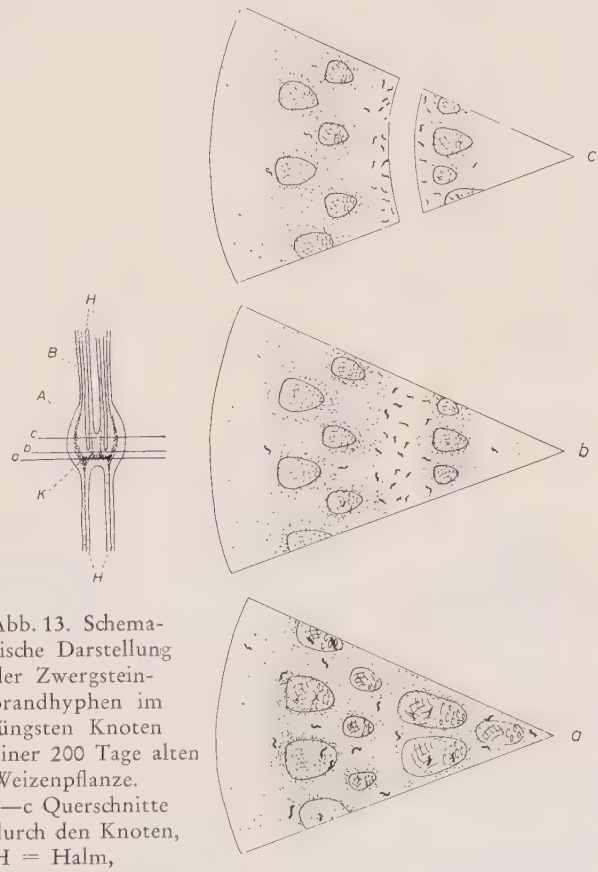


Abb. 13. Schematische Darstellung der Zwergsteinbrandhyphen im jüngsten Knoten einer 200 Tage alten Weizenpflanze.
a—c Querschnitte durch den Knoten,
H = Halm,
B = Blattscheide,
A = Anschwellung der Blattscheide,
K = Stengelknoten

Internodien bei gesunden und kranken Pflanzen in diesem Stadium ist in Tabelle 12 wiedergegeben. Eine stärkere Verkürzung der mittleren Internodien befallener Weizenhalme, wie es die erste Ablesung am 2. 5. ergab, konnte nicht mehr festgestellt werden.

In den Blättern war der Parasit im Parenchym, in den Leitbündeln mit dem Festigungsgewebe der Blattscheiden und -spreiten in kleinen Hyphenstücken in den Interzellularen vorhanden.

Nach 220 bis 250 Tagen (Ende Juni bis Mitte Juli): Zu diesem Zeitpunkt begannen die gesunden Pflanzen zu blühen. Sie hatten eine Länge von ungefähr 70 cm, die befallenen dagegen eine von höchstens 37 cm erreicht. Die Blätter der kranken Pflanzen zeigten eine schwach gelblichgrüne Farbe, während die gesunden noch dunkelgrün waren. Die zunächst zahlreich angelegten Seitentriebe der infizierten Pflanzen vertrockneten zum größten Teil, ohne voll ausgereift zu sein. Es war in den darauffolgenden Wochen auffällig, daß die zwergsteinbrandkranken Pflanzen sehr schnell gelb und trocken wurden, die gesunden hingegen noch dunkelgrün und saftig waren.

Die Gründe für diese offensichtliche Schädigung der befallenen Pflanzen konnten durch anatomische Untersuchungen nicht festgestellt werden. Der Brandpilz war mit Ausnahme der Fruchtknoten nur noch vereinzelt in der Ährenspindel, den Spelzen, in den Knoten der Halme und in den Blättern zu finden. Die Hyphen kamen in den Interzellularen vor und enthielten meistens kein Plasma mehr. Ob diese Myzelreste in der Lage sind, in den basalen Knotengeweben zu perennieren, ähnlich wie in brandbefallenen Halmen von *Agropyron repens*, müssen weitere Versuche zeigen.

Die Ausbreitung des Zwergsteinbrandes in der resistenten Sorte „Wasatsch" (Serie 5) und in dem nicht anfälligen Petkuser Winterroggen (Serie 6) verlief in den wenigen Pflanzen, in denen der Parasit den Vegetationskegel erreichen konnte, in der gleichen Weise wie eben beschrieben. Die befallenen Halme waren in der Serie 5 um 25 %, in der Serie 6 um 63,6 % verkürzt.

2. Beim Roggensteinbrand und dem gewöhnlichen Steinbrand

Die Untersuchungen am Roggensteinbrand und am gewöhnlichen Steinbrand ergaben ein ähnliches Bild der weiteren Besiedelung der Wirtspflanze wie beim Zwergsteinbrand. Wachstum und Ausbreitung der Hyphen erfolgte ebenfalls nur in den meristematischen Zonen der Ährenanlage, während sie sich in den älteren sklerenchymatischen Geweben teilweise auflösten und daher in der reifen Pflanze nur noch vereinzelt in den Knoten und den Blättern zu finden waren. Sie unterschieden sich vom Zwergsteinbrand nur durch eine weitaus stärkere Entwicklung des Myzels im Wirtsgewebe.

Beim Roggensteinbrand (Serie 7, 8) waren die befallenen Pflanzen stark verzwergt (42,3 %), die Verkürzung beim gewöhnlichen Steinbrand (Serie 9, 10, 11, 12) war dagegen nur gering (10 %).

Bei allen drei Steinbrandarten konnte an keiner Stelle der Entwicklung in den vegetativen Teilen der Wirtspflanze ein Eindringen des Pilzes in das Zellumen oder gar Haustorienbildung beobachtet werden. Wirt und Parasit

wuchsen ohne sichtbare gegenseitige Behinderung oder Verdrängung nebeneinander her.

IV. Sporenbildung

Die Sporenentwicklung im Fruchtknotengewebe der Wirtspflanze und die Ausbildung der Brandbutte wurde am Zwergsteinbrand und am gewöhnlichen Steinbrand untersucht. Vergleichend zu der Vollbrandbutte wurden partialbefallene Körner geschnitten, die nur in einzelnen Teilen brandig waren, in anderen aber gesundes Aussehen hatten.

1. Entwicklung der Vollbrandbutte

Beginn der Sporenbildung beim Zwergsteinbrand Anfang Juni: Die Halme der gesunden Pflanzen hatten eine durchschnittliche Länge von 63,3 cm, die Ähren eine solche von etwa 6,3 cm erreicht. Im Fruchtknoten waren die mehrschichtige Fruchtknotenwand, die beiden je zweischichtigen Integumente und der Nuzellus voneinander zu unterscheiden (Abb. 14 G_1). Die kranken Pflanzen waren im Durchschnitt 31 cm, die Ähren ungefähr 2,4 cm lang. Ihre Fruchtknoten waren normal entwickelt.

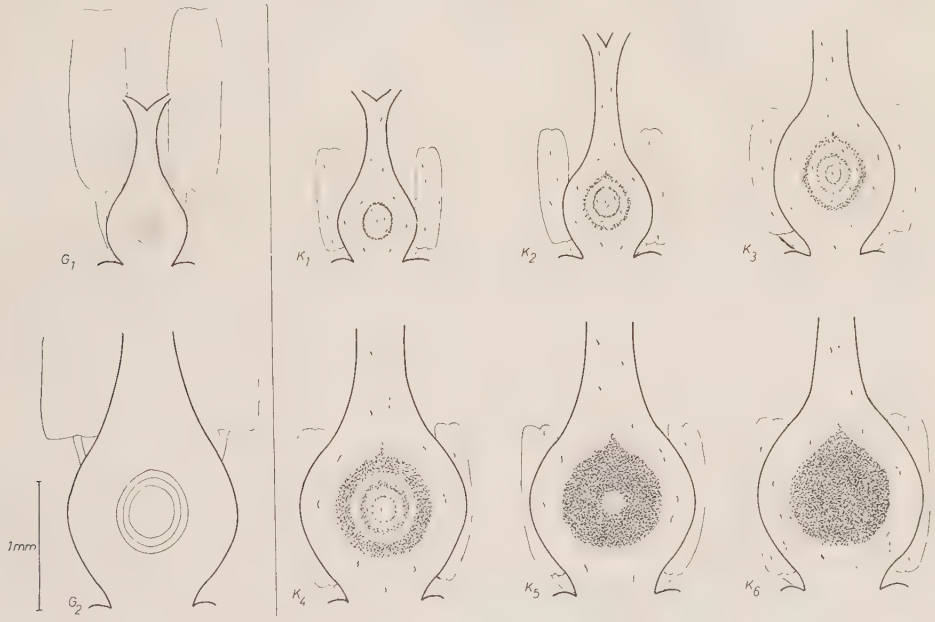


Abb. 14. Schematische Darstellung der Entwicklung der Zwergsteinbrandbutte: Längsschnitte durch gesunde (G_1, G_2) und befallene Fruchtknoten (K_{1-6})

Der Brandpilz befand sich zu diesem Zeitpunkt interzellular in allen Blütenteilen (Abb. 12 b). Während sich die Hyphen in den Antheren (Abb. 15), Lodiculae und Spelzen nicht weiter ausbreiteten und teilweise schon plasmaleer waren, trat innerhalb des Fruchtknotens als erstes Anzeichen der Sporenbildung eine Verdichtung des Myzels zwischen Frucht-

knotenwand und äußerem Integument auf (Abb. 14 K_1). Der Pilz begann in diesen Geweben seine bisherige interzellulare Lebensweise aufzugeben, drängte die einzelnen Zellschichten des Integumentes und in geringerem Maße die der Fruchtknotenwand auseinander und stieß in das Zellumen vor (Abb. 16). Der Inhalt der Hyphen wurde tröpfchenartig (Abb. 17 a), und sie schwollen an den Enden bläschenförmig an (b). Diese Blasen vergrößerten sich sehr schnell und bildeten zu den Hyphen Scheidewände aus (c, d).

Nach kurzer Zeit wurde ein zweiter Myzelring zwischen den beiden Integumenten sichtbar (Abb. 14 K_2), und wenig später bildete sich ein dritter Kranz am Rande des Nuzellus heraus (K_3). Von diesen drei Zonen aus erfolgte die Ausbreitung in die Integumente hinein (K_4). Schließlich waren sie von sporenbildenden Hyphen durchsetzt und nur der Nuzellus noch zu erkennen, der dann vom inneren Integument her vom Myzel durchdrungen wurde (K_5), so daß bald darauf die Samenanlage vollständig von Hyphenresten und Sporen ausgefüllt war (K_6).

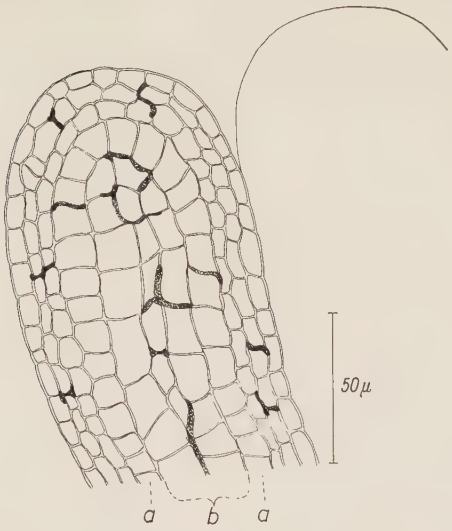


Abb. 15. Längsschnitt durch den Pollensack einer 200 Tage alten Weizenpflanze: Interzellulare Ausbreitung der Zwergsteinbrandhyphen. a Tapetum, b Pollenmutterzellen

Die Fruchtknotenwand bestand zu diesem Zeitpunkt aus etwa 10 bis 15 Zellagen. Während die Hyphen auch in diese Gewebe weiter vordringen konnten, hatten die Sporen im Innern der jungen Brandbutte verschiedene Reifestadien erreicht, die ihre Entwicklung erkennen ließen (Abb. 17): die Außenkonturen des gebildeten Bläschens verstärkten sich (e), die Sporen-

Abb. 16. Längsschnitt durch den Fruchtknoten einer 200 Tage alten Weizenpflanze: Verdichtung der Zwergsteinbrandhyphen zwischen Fruchtknotenwand und äußerem Integument.
a Fruchtknotenwand
b äußeres Integument
c inneres Integument
d Nuzellus

wand differenzierte sich innerhalb dieser ersten Membran heraus (f). Der Sporeninhalt verdichtete sich und hob sich deutlich von der umgebenden helleren Hülle ab. Danach begann die Leistenbildung vom Rande der Sporenwand in die Hülle hinein (g). Der tröpfchenförmige Inhalt war nach der anschließenden Braunfärbung nicht mehr zu erkennen (h).

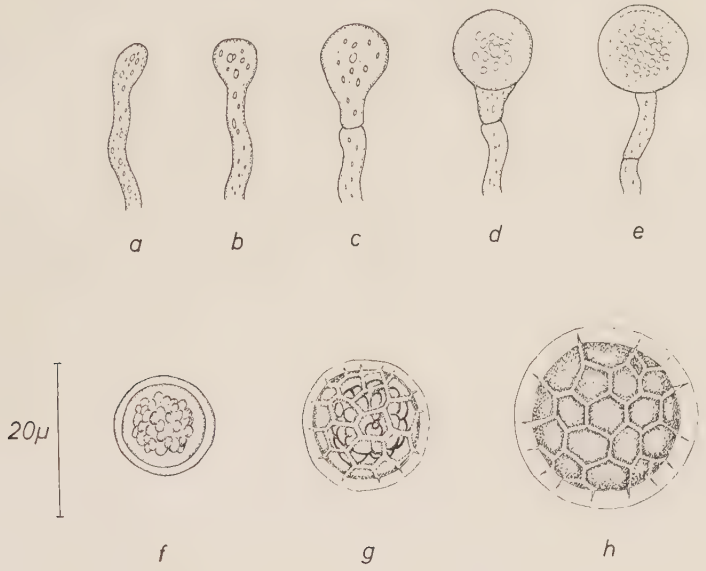


Abb. 17. Ausbildung der Zwergsteinbrandsporen.
a—g hyaline Sporen, h ausgereifte braune Spore

Tabelle 13 gibt an, zu welchem Prozentsatz die einzelnen Entwicklungsstadien an der Zusammensetzung der Brandbutte beteiligt sind. Es geht daraus hervor, daß in dieser Phase (am 10. 6.) der größte Teil aus ungefärbten, hyalinen Sporen bestand, deren Ausdifferenzierung verschieden weit fortgeschritten war.

Mitte Juni: Die gesunden Pflanzen begannen zu blühen. Die Fruchtknoten waren im Durchschnitt 3 mm lang, ihre Wand setzte sich aus der äußeren Epidermis, dem parenchymatischen Gewebe mit der anschließenden chlorophyllführenden Schicht und der inneren Epidermis zusammen. Die Staubgefäße hatten eine Länge von ungefähr 4 mm. Die Butten der befallenen Pflanzen, auch etwa 3 mm lang, hoben sich von den gesunden Fruchtknoten deutlich durch ihre tiefgrüne Farbe ab. Die Narbenäste waren entwickelt und die Lodiculae schwach geschwollen. Die Staubgefäße mit den ausgebildeten Pollenkörnern waren gelb gefärbt, hatten aber nur eine Länge von 1 mm erreicht.

Das Pilzmyzel hatte sich in der Buttenwand weiter ausgebreitet. Es waren in diesem Stadium nur noch drei bis fünf Zellagen zu erkennen, die mit Ausnahme der Epidermiszellen reichlich Chlorophyllkörner enthielten. Die Sporen hatten zum größten Teil schon strukturierte Oberflächen. Nur in der Buttenwand bestand noch eine sporenbildende Zone (Tab. 13).

Tabelle 13

Anteile der einzelnen Sporenentwicklungsstadien des Zwergsteinbrandes bei der Entstehung der Brandbutte (in %)

Datum	A	B	C	D	E
	bläschenförmige Anschwellung der Hyphen	hyaline Sporen mit Tröpfcheninhalt: mit einfacher Membran	mit doppelter Membran	mit strukturierter Oberfläche	reife braune Sporen
10. 6.	5	25	25	25	20
22. 6.	2	5	5	40	50
1. 7.	nur am Rande noch vorhanden	5	5	5	85
25. 7.		3	2	5	90

Anfang Juli: Die Frucht in den gesunden Pflanzen hatte eine Größe von etwa 4 mm. In den befallenen Pflanzen war die Brandbutte ungefähr 5 mm lang und begann braun zu werden. Die Antheren reichten bis zur Hälfte der Butte und vertrockneten.

Während die Fruchtwand der gesunden Körner aus etwa zehn Zellagen bestand, hatte der Pilz in diesem Stadium die Buttenwand bis auf zwei bis drei Zellschichten aufgelöst und bildete in dieser Zone noch immer Sporen aus. Der Inhalt der Butte setzte sich hauptsächlich aus reifen Brandsporen zusammen, und nur ein geringer Anteil war noch ungefärbt. Diese hyalinen Sporen kamen vor mit einfacher Wandung (Tab. 13, B), mit doppelter Membran (C) oder mit strukturierter Oberfläche (D). Auch bei der weiteren Ausreifung der Brandbutte verschob sich das Verhältnis der verschiedenen Sporenanteile nicht mehr wesentlich.

Die Entwicklung der Butten in zwergsteinbrandbefallenen Roggenpflanzen (Serie 6) wurde nicht im einzelnen untersucht. Es war aber auffällig, daß die Brandbutten die gleiche runde Form wie beim Zwergsteinbrand des Weizens und nicht die längliche der Roggensteinbrandbutten hatten

Abb. 18. Brandbutten (nat. Größe) von links nach rechts von: Roggen (*Tilletia secalis*), Roggen (*Tilletia contraversa*), Weizen (*Tilletia contraversa*)

(Abb. 18). Sie enthielten knapp 10 % hyaline Sporen. Die reifen, braunen Brandsporen waren wie beim Weizenzwergsteinbrand heller gefärbt als beim Roggensteinbrand. Ihre Hülle war etwa 1,5 bis 2 μ breit.

Die Ausbildung der Brandbutte beim gewöhnlichen Steinbrand verlief in der gleichen Weise wie beim Zwergsteinbrand. Das Pilzmyzel war ebenfalls bei der Differenzierung der Ährchen in alle Blütenteile gelangt. Die Sporen, auch endständig an den Hyphensträngen abgeschnürt, entstanden am Rande der beiden Integumente und des Nuzellus und zerstörten von diesen drei Zonen aus die Samenanlage. Die Antheren wurden zwar ausgebildet, vertrockneten jedoch bald.

Bei der Entwicklung der Vollbrandbutten waren sowohl beim Zwergsteinbrand wie auch beim gewöhnlichen Steinbrand keine Anzeichen zu erkennen, daß eine Befruchtung stattgefunden hatte.

2. Entstehung partialbefallener Körner

In den Serien mit dem gewöhnlichen Steinbrand kamen vereinzelt neben den vollausgebildeten Brandbutten Körner vor, die normal entwickelt waren (Länge: 7 mm, Breite: 4 mm), aber an einigen Stellen schwarze Flecke aufwiesen. Die Fruchtwand war in diesen Bezirken von sporenbildendem Brandmyzel bis auf wenige Zellschichten aufgelöst. Embryo, Endosperm und Samenschale waren nur geringfügig durch den Pilz von der Fruchtwand verdrängt (Abb. 19), hatten jedoch keine Hyphen in ihren Geweben.

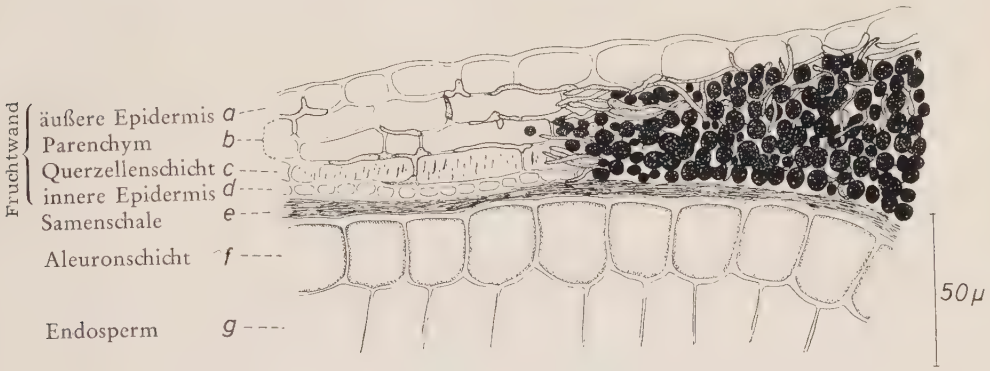


Abb. 19. Querschnitt durch den Randteil eines partialbefallenen Weizenkornes: Zwergsteinbrandhyphen in der Fruchtwand

Diese Ergebnisse stimmen überein mit den Angaben von Gassner (10) über die Ausbildung partialbefallener Weizenkörner durch den gewöhnlichen Steinbrand *Tilletia foetida*. Er stellte ebenfalls fest, daß der Parasit lediglich auf die Fruchtwand beschränkt ist. Embryo und Endosperm sind nicht infiziert. Sie werden nur je nach dem Ausmaß des Befalls mehr oder weniger stark an die Seite gedrückt.

Das Bild der partialbefallenen Körner zeigt eindeutig, daß eine Befruchtung erfolgt sein muß, denn Embryo und Endosperm werden entwickelt,

und es findet eine Umschichtung der Integumente zur Samenschale statt. Während bei der Vollbrandbutte alle Gewebe des Fruchtknotens bis auf wenige Zellschichten der Wand durch den Brandpilz zerstört werden, sind in den partialbefallenen Körnern nur die Zellen der Fruchtwand teilweise von den Hyphen angegriffen. Die Samenschale jedoch, wie GASSNER ausführt, widersteht dem Angriff.

E. Diskussion

Weg des Pilzes:

Das Steinbrandmyzel muß nach dem Eindringen in den Keimling den Vegetationskegel erreichen, nur dann kann es mit dem Wachstum der Wirtspflanze an den Ort der Sporenbildung in den Ähren gelangen. Auf dem Wege zum Vegetationskegel trifft es zuerst auf die Seitenknospen. Da sich die Hyphen in der Nährpflanze verhältnismäßig langsam und vorwiegend in den embryonalen Zonen ausbreiten, können sie oft nur bis zu den Anlagen der Seitentriebe vorstoßen, wie es auch LANG (16) in seinen Untersuchungen über den gewöhnlichen Steinbrand festgestellt hat. BÖNING (2) machte ebenfalls die Beobachtung, daß unter natürlichen Bedingungen bei einer Nachwinterinfektion in erster Linie die Nebentriebe betroffen waren.

In den Versuchen mit verletzt inokulierten Keimlingen trat ein wesentlich höherer Anteil befallener Pflanzen auf als in denjenigen mit unverletzten Keimlingen. Der Grund ist darin zu sehen, daß der Weg des Myzels nicht durch die am weitesten entwickelten äußeren Blätter führt, sondern von der Schnittfläche in den Blattzwischenräumen abwärts bis zu deren Basis und von dort direkt in die meristematischen Gewebe der Sproßachse.

Voraussetzung für einen hohen Befall nach künstlicher Infektion mit Zwerg- und Roggensteinbrand ist eine genügend tiefe Temperatur. Höhere Wärmegrade (15 °C) hemmen, im Gegensatz zum gewöhnlichen Steinbrand, die Ausbreitung des Parasiten und beschleunigen die Entwicklung des Wirtsgewebes. Beide Faktoren beeinträchtigen das Vordringen des Pilzes zum Vegetationskegel und verhindern den Befall. Ob die Einwirkung einer höheren Temperatur auch dann noch den Verlauf der Erkrankung beeinflussen kann, nachdem der Parasit den Vegetationskegel erreicht hat, wurde nicht geprüft. Nach SEMPIO (28) kann jedoch beim gewöhnlichen Steinbrand in fortgeschrittenem Stadium die Entwicklung des Pilzes in befallenen Ähren durch fünftägige oder längere Erwärmung auf 35 °C unterdrückt werden.

Deutlich erkennbare Sperren im Wirtsgewebe, wie sie AMOS (1) in seinen Flugbranduntersuchungen nachweist, konnten beim Steinbrand nicht gefunden werden. Im Gegensatz zur Keimlingsinfektion des Steinbrandes dringt der Weizenflugbrand vom Scutellum aus in den Embryo ein. Die Infektionshyphen müssen daher vor der Verhärtung des Keimknotens und des ersten Halmknotens den Vegetationskegel erreicht haben, um einen Befall hervorzurufen. Ist der Pilz nicht in der Lage, diese Gewebe vor ihrer Ausdifferenzierung zu überwinden, so kann auch kein Teilbefall mehr erzielt werden, da alle Seitenknospen über dem Keimknoten angelegt werden. Der Stein-

brand dringt oberhalb dieser Sperrzone in den Keimling ein, ihre Ausbildung kann deshalb den Weg der Hyphen zum Vegetationskegel nicht beeinflussen.

Das Eindringen des Zwergsteinbrandes in das Wirtsgewebe verläuft in anfälligen und resistenten Sorten gleich. In resistenten Pflanzen gelangt er jedoch nicht über die äußersten Koleoptilenschichten hinaus. Obwohl hier offensichtlich eine Wachstumshemmung vorliegt, sind durch anatomische Untersuchungen keinerlei Veränderungen am Myzel zu erkennen. Das gleiche stellte Woolman (32) beim gewöhnlichen Steinbrand und Ling (17) bei *Urocystis occulta* (Wallr.) Rab. fest.

Verschiedene Grade der Resistenz, wie sie Western (31) für *Ustilago avenae* (Pers.) Rostr. und *Ustilago kolleri* Wells angibt, traten nicht auf. Nach Brandwein (4) können diese beiden Arten in resistenten Sorten einen latenten Befall bewirken, der aber keinen Einfluß auf das Wachstum der Pflanzen zeigt. Nach Zade (33) verursacht ein latenter Befall mit gewöhnlichem Steinbrand eine Schwächung der Wirtspflanzen. Derartige Beobachtungen konnten in den vorliegenden Untersuchungen nicht gemacht werden.

Wuchsbild der Hyphen:

Die Wuchsform des Steinbrandes ändert sich im Laufe seiner Entwicklung. Auf der Koleoptile bildet er sehr schnell ein großes Hyphennetz aus. Churchward (5) stellte an *Tilletia caries* fest, daß ein Eindringen der Hyphen in die Epidermis der Wirtspflanze immer nur interzellular verläuft. Aus den eigenen Untersuchungen ging hervor, daß der Pilz in den meisten Fällen die äußersten Zellschichten der Koleoptile intrazellular durchdringt, um dann interzellular weiterzuwachsen. Haustorienbildung war dabei an keiner Stelle zu erkennen. Die gleichen Angaben macht Lang (16) in seiner Arbeit über die Beeinflussung der Wirtspflanze durch den gewöhnlichen Steinbrand. Nach Fischer und Holton (8) ist das Wachstum der Brandpilze in ihren Wirtspflanzen vorwiegend interzellular. Nur bei wenigen Arten werden Haustorien ausgebildet, u. a. bei *Tuburcinia trientalis* Berk. u. Broome und bei *Ustilago maydis* (DC.) Corda.

Beim Steinbrand ist die Verträglichkeit zwischen Wirt und Parasit so groß, daß der Pilz keine sichtbare Veränderung der Wirtszellen verursacht. Das gleiche stellte Woolman (32) in seinen Untersuchungen fest. In älteren Geweben der sich streckenden Pflanze ist das Myzel nur spärlich zu finden, da es sich zum größten Teil nach kurzer Zeit auflöst. Die Entwicklung anderer Brandarten in ihren Wirtspflanzen ergibt in den meisten Fällen ein vom Steinbrand unterschiedliches Bild. Nach Ling (17) werden die Hyphen von *Urocystis occulta* in allen Gewebeteilen zahlreich ausgebildet. Lang (16) berichtet, daß *Ustilago avenae* im Sproß der Haferpflanze reichlich Myzel entwickelt, die älteren Hyphenteile sich aber an keiner Stelle wie beim Steinbrand auflösen. Er nimmt an, daß durch den Zerfall der Steinbrandhyphen Abbauprodukte entstehen, die eine Wachstumshemmung der Weizenpflanze bewirken können. Pichler (22) lehnt eine chemische Wirkung des Pilzes auf die Wirtspflanze ab, da nur die Halme, nicht aber die Ähren verkürzt werden. Aus den eigenen Versuchen konnte dazu nur festgestellt werden, daß

der Zwergwuchs äußerlich auf einer Verkürzung der Internodien beruht. Sie wird nicht durch eine Veränderung der Wirtszellen oder durch Verstopfung der Gefäße hervorgerufen. Die Frage nach den Ursachen des Zwergwuchses muß daher offenbleiben.

Die vorliegenden Untersuchungen lassen erkennen, daß der Steinbrand in den vegetativen Teilen der Wirtspflanze nur als reiner Raumparasit vorkommt. Erst mit der Sporenbildung im Fruchtknotengewebe beginnt die eigentliche Schädigung der Nährpflanze.

Fruktifikation:

In diesem Stadium, das sich nur auf die Ähren beschränkt, greift der Pilz die Wirtszellen aktiv an und löst sie teilweise auf. Bei der einsetzenden Sporenbildung entstehen zuerst hyaline Sporen, die mit zunehmender Reife in strukturierte, braungefärbte übergehen. Nur ein geringer Prozentsatz bleibt auch in der reifen Brandbutte noch hyalin. Der Entwicklungsgang läßt vermuten, daß diese Sporen nur bis zu einem bestimmten Stadium ausgebildet sind und die Reife der braunen nicht erreicht haben. Nach HOLTON (14) sind sie haploide Zellen. Da die Kernverhältnisse in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurden, kann dazu nicht Stellung genommen werden.

Der Ort der Sporenbildung in den Vollbrandbutten ist die Samenanlage. Der Pilz gelangt schon während der Ausdifferenzierung der einzelnen Ährchen in deren Gewebe und zerstört sie durch sporenbildendes Myzel. Es konnten keine Anzeichen einer eingetretenen Befruchtung festgestellt werden. LANG (16) beschreibt ebenfalls für den gewöhnlichen Steinbrand das Vorhandensein der Hyphen in und zwischen den Integumenten sowie in der Fruchtknotenwand. Auch nach Angaben von FISCHER und HOLTON (8) wird bei der Ausbildung von Vollbrandbutten die Samenanlage durch den Parasiten zerstört.

Etwas anders liegen die Verhältnisse bei partialbefallenen Körnern, die nur beim gewöhnlichen Steinbrand untersucht wurden. Hier war der Pilz lediglich auf die Fruchtwand beschränkt. Eine Befruchtung hatte offensichtlich noch stattgefunden, denn Embryo, Endosperm und Samenschale waren deutlich ausgebildet.

Über den Partialbefall und die Entstehung der Vollbrandbutte äußert GASSNER (10) folgende Ansicht: „Mit steigender Infektion der Fruchtwand durch den Brandpilz kommt es zu einem immer stärkeren Zurückdrängen und schließlich zu einer völligen Unterdrückung der Samenanlage. Im ersten Fall liegen Partialbrandkörner mit reichlichen Sporenmassen und sichelförmig verkümmertem Endosperm, im zweiten Fall Vollbrandbutten vor." Danach soll beim gewöhnlichen Steinbrand in keinem Falle eine Infektion und damit eine unmittelbare Zerstörung der Samenanlage durch das Pilzmyzel stattfinden, sondern nur eine Behinderung ihrer Entwicklung.

Diese offenbaren Widersprüche zu den eigenen Feststellungen sind möglicherweise damit zu erklären, daß GASSNER mit *Tilletia foetida* arbeitete, die eigenen Untersuchungen dagegen mit *Tilletia caries* und *Tilletia contraversa*

durchgeführt wurden. Wichtiger ist aber wohl der unterschiedliche Ausgangspunkt beider Arbeiten. Während GASSNER nur ältere Stadien nach der Befruchtung untersuchte und daraus allgemeine Schlüsse zieht, wurde in den eigenen Versuchen die Ausbildung der Brandbutte vom Beginn der Sporenbildung im Fruchtknotengewebe verfolgt. Gerade diese Entwicklung zeigt, daß Partialbefall und Vollbrandbutte n i c h t durch Zwischenstufen ineinander übergehen.

Nach allem ist es wahrscheinlich, daß es zwei Möglichkeiten für einen Steinbrandbefall der Ähren gibt:

a) Die Ausbildung der Vollbrandbutte: der Pilz besiedelt die ganze Samenanlage, bevor eine Befruchtung erfolgt.

b) Die Ausbildung partialbefallener Körner: es hat eine Befruchtung stattgefunden und damit die Umbildung der Integumente in die Samenschale. Sie bildet ein Hindernis für die weitere Ausbreitung des Pilzes in die Gewebe des Endosperms und den Samen. Die Entwicklung der Sporen beschränkt sich daher auf die Zellschichten der Fruchtwand. Teilbefallene Körner können jedoch eine solche Stärke der Erkrankung erreichen, daß der verdrängte Samen nicht mehr zu erkennen ist und eine vollentwickelte Brandbutte vorgetäuscht wird.

Zusammenfassung

Es wird über anatomische Untersuchungen berichtet, bei denen die Entwicklung des Pilzmyzels vom Zwergsteinbrand, Roggensteinbrand und dem gewöhnlichen Steinbrand von der Inokulation der Wirtspflanze bis zur Sporenbildung in den einzelnen Ähren verfolgt wurde. Die Färbung der Hyphen im Wirtsgewebe wurde mit einer Baumwollblaulösung nach POPP und mit der bei WOOLMAN angegebenen GRAMschen Färbung durchgeführt.

1. Der Weg des Steinbrandes in anfälligen Wirtssorten vom Eindringen bis zum Erreichen des Vegetationskegels wurde unter verschiedenen Bedingungen beobachtet.

a) In unverletzten Keimlingen: Der Pilz durchdringt die äußeren Schichten der Koleoptile intrazellular, die weitere Ausbreitung verläuft interzellular. Beim Zwerg- und Roggensteinbrand haben nur wenige Hyphen nach 50 Tagen den Vegetationskegel erreicht. Der Hauptanteil gelangt nicht über die Koleoptile hinaus und kann im günstigsten Fall eine Infektion der äußersten Seitenknospen bewirken. Beim gewöhnlichen Steinbrand ist nach der gleichen Zeit bei etwa 30 % der untersuchten Pflanzen Myzel im Vegetationskegel vorhanden.

b) In verletzten Keimlingen: Der Weg des Pilzes ist bei allen drei Steinbrandarten gleich. Die Hyphen wachsen hauptsächlich von der Schnittfläche aus in den Blattzwischenräumen abwärts und gelangen an deren Basis in die meristematischen Gewebe der Sproßachse. Im Vegetationskegel ist nach 30 Tagen bei ungefähr der Hälfte der untersuchten Pflanzen Myzel zu finden.

c) Bei verschiedenen Temperaturen: Zwerg- und Roggensteinbrand können nur bei tiefer Temperatur (3 °C) Infektionsmyzel bilden und sich in der Nährpflanze ausbreiten. Durch die Einwirkung einer höheren Temperatur (15 °C) werden die Hyphen in ihrer Entwicklung gehemmt. Da gleichzeitig das Wachstum der Wirtspflanze beschleunigt wird, gelingt eine Infektion nur in Ausnahmefällen. Hat der Pilz dagegen die Möglichkeit, zunächst bei tiefer Temperatur von der Schnittfläche aus zwischen den Blättern abwärts zu wachsen und an deren Basis in das Wirtsgewebe einzudringen, so sind trotz der anschließenden Einwirkung einer höheren Temperatur bei etwa 30 % der untersuchten Pflanzen nach 30 Tagen Hyphen im Vegetationskegel vorhanden. Der gewöhnliche Steinbrand kann bei tiefer wie bei höherer Temperatur Infektionsmyzel entwickeln und die Wirtspflanze besiedeln. Auch bei etwa 15 °C sind die Hyphen in unverletzten Pflanzen (bei etwa 50 %) nach 50 Tagen im Vegetationskegel anzutreffen.

2. Zwergsteinbrandmyzel ist in der Lage, in verletzte Keimlinge resistenter Wirtssorten (Winterweizen „Wasatsch“) und -arten (Petkuser Winterroggen) einzudringen. Es kann sich aber nicht in den Geweben weiter ausbreiten. Die tieferen Gründe dafür sind in anatomischen Untersuchungen nicht zu erkennen.

3. Mit der fortschreitenden Entwicklung der Wirtspflanzen durchdringt das Steinbrandmyzel die Zellschichten der Ährenanlage und gelangt mit der Differenzierung der Ährchen in alle Blütenteile.

In den vegetativen Organen sind die Hyphen zunächst in der Sproßachse und den Blättern zu finden. Bei der Ausbildung der Internodien kommen sie vorwiegend in den Nodien vor und sind in der reifen Pflanze nur noch vereinzelt in den Knoten und Blättern anzutreffen.

4. Die Sporen des Steinbrandes werden endständig an den Hyphen gebildet. Sie sind in den ersten Stadien der Entwicklung farblos, mit glatter Oberfläche und einfacher Membran. Die Sporenwand mit den typischen Leisten wird innerhalb dieser äußeren Membran angelegt. In der reifen Butte ist neben den braunen ein geringer Prozentsatz (8 %) farbloser, hyaliner Sporen vorhanden: a mit einfacher Wandung, b mit doppelter Wandung, c mit strukturierter Oberfläche.

5. Die Sporen entstehen bei der Ausbildung der Vollbrandbutte im Fruchtknotengewebe, und zwar am Rande der Fruchtknotenwand, zwischen den Integumenten sowie am Nuzellus. Von diesen drei Zonen aus erfolgt die Zerstörung der Samenanlage. Anzeichen einer eingetretenen Befruchtung sind nicht zu erkennen.

Beim Partialbefall befindet sich das Pilzmyzel nur in der Fruchtwand. Eine Befruchtung ist erfolgt, Embryo und Endosperm mit der umgebenden Samenschale sind entwickelt.

6. Die Wuchsart des Myzels ist bei allen drei Steinbrandarten gleich. Die Hyphen breiten sich vorwiegend in den embryonalen Zonen aus, während sie in älteren sklerenchymatischen Geweben nur vereinzelt vorkommen, teil-

weise plasmaleer sind und sich auflösen. Ihre Anpassung an die Zellwände ist so groß, daß sie ohne Färbung nicht zu erkennen sind. Eine Veränderung des Wirtsgewebes durch den Parasiten ist außer im Fruchtknoten nirgends festzustellen.

Summary

Anatomical investigations on the penetration and spread of *Tilletia* species in cereal plants.

A report is given of anatomical investigations in which the development of the fungus mycelium from inoculation of the host plant up to the time of spore formation was followed in individual ears infected with dwarf bunt, rye smut and common smut. Staining of the hyphae in the host tissue was carried out with Popp's cotton blue solution and with the Gram coloration described by Woolman.

1. The course of the smut in susceptible host varieties was observed from penetration up to the time it reached the growing point, under various growth conditions:

a) in unwounded seedlings the fungus penetrates the outermost layers of the coleoptile intracellularly and then spreads intercellularly. In dwarf bunt and rye smut very few hyphae had reached the growing point after 50 days. The majority does not spread beyond the coleoptile and under favourable circumstances can cause infection of the side tillers. In common smut the mycelium reaches the growing point in about 30 % of the plants after the same time.

b) in wounded seedlings, the course of the fungus is similar in all three smuts. The hyphae grow chiefly from the cut surfaces outwards, passing through the interstitial spaces of the leaves and reach the meristematic tissues of the shoot axis at the base of the leaves. After 30 days mycelium can be found in the growing point in about half of the plants examined.

c) at different temperatures, dwarf bunt and rye smut can form an infectious mycelium and spread in the host only at low temperatures (3 °C). The hyphae are inhibited in growth by the host action of high temperature (15 °C). Since the growth of the host plant is at the same time accelerated, infection results only in exceptional cases. If on the other hand the fungus is enabled to develop first at low temperatures and to spread from the wound surface downwards between the leaves, and thus to penetrate the host tissue at the base of the leaves, even then, if the latter development takes place at high temperatures some 30 % of the plants examined have hyphae present in their growing points after 30 days. Common smut can form mycelia and attack the host plants at both high and low temperatures. Even at 15 °C hyphae are found in the growing points of unwounded plants (about 50 %) after 50 days.

2. The mycelium of dwarf bunt is able to penetrate wounded seedlings of resistent host varieties (Winter wheat "Wasatsch") and species (winter rye "Petkus"). It is however not able to spread further in the tissues. The true reasons for this cannot be revealed by anatomical investigations.

3. With the further development of the host plants the smut mycelium penetrates the cell layers of the ear primordium and with the differentiation of the spikelets penetrates into all floral parts.

In the vegetation organs the hyphae are first found in the shoot axis and the leaves. On the development of the internodes they come to be found principally in the nodes and in mature plants they are to be found only sporadically in the nodes and leaves.

4. The smut spores are formed terminally on the hyphae. In the early stages of development they are colourless, with a smooth surface and simple membrane. The spore wall with the typical markings is laid down inside this membrane. In the mature sporangium a small proportion (8 %) of colourless hyaline spores are found in addition to the brown spores [a) with simple wall, b) with double wall and c) with markings on the surface].

5. In the formation of the full smut ball the spores are formed in the ovary tissue between the integuments and in the nucellus. The destruction of the seed primordium proceeds from these three zones.

In a partial infection the fungus mycelium occurs only in the wall of the ovary. Fertilization occurs and embyro and endosperm are formed together with the surrounding seed coat.

6. The form of growth of the mycelium is the same in all three smut species. The hyphae spread mainly in the embryonic zones, occurring only sporadically in older sclerenchymatous tissues, where they are partially devoid of cytoplasm and dissolve. They are so closely appressed to the cell wall that they cannot be detected without staining. No alteration of the host tissue by the parasite has been detected except in the ovaries.

Literaturverzeichnis

1. AMOS, W., 1952: Über die Entwicklung des Flugbrandmyzels in infizierten Weizenpflanzen. Diss. T. H. Braunschweig.

2. BÖNING, K., 1955: Zur Frage der Nachwinterinfektion durch Zwergbrand. Z. Pflanzenbau u. Pflanzenschutz **6**, 207—209.

3. — —, F. WAGNER und A. v. MINCKWITZ, 1953: Untersuchungen zur Keimungsbiologie und Beizung der Sporen des Zwergbrandes an Weizen. Z. Pflanzenbau u. Pflanzenschutz **4**, 49—71.

4. BRANDWEIN, P. F., 1937: Experiments on latent infection of resistant varieties by the loose and covered smut of oats. Bull. Torr. Bot. Club **64**, 433—444.

5. CHURCHWARD, J. G., 1940: The initiation of infection by bunt of wheat (*Tilletia caries*). Ann. appl. Biol. **27**, 58—64.

6. DASTUR, J. F., 1921: Cytology of *Tilletia tritici* (Bjerk.) Wint. Ann. Bot. **35**, 399—407.

7. Fellows, H., 1928: Some chemical and morphological phenomena attending infection of the wheat plant by *Ophiobolus graminis*. J. agric. Res. **37**, 647—662.

8. Fischer, G. W., and C. S. Holton, 1957: Biology and control of the smut fungi. The Ronald Press Company, New York.

9. Gäumann, E., 1951: Pflanzliche Infektionslehre. Verl. Birkhäuser, Basel.

10. Gassner, G., 1938: Über Partialinfektionen von Weizenkörnern durch *Tilletia* und die Entstehung der Steinbrandbutten. Phytopath. Z. **11**, 451—468.

11. — —, 1953: Untersuchungen über Keimungsbedingungen und Bekämpfungsmöglichkeiten beim Zwergsteinbrand (*Tilletia brevifaciens*) im Laboratorium. Phytopath. Z. **21**, 53—62.

12. — —, und E. Niemann, 1954: Untersuchungen über die Temperatur- und Lichtabhängigkeit der Sporenkeimung verschiedener *Tilletia*-Arten. Phytopath. Z. **21**, 367—394.

13. — —, und — —, 1955: Über die Beeinflussung der Sporenkeimung des Zwergsteinbrandes und Roggensteinbrandes durch verschiedene Chemikalien. Phytopath. Z. **23**, 121—140.

14. Holton, C. S., 1941: Preliminary investigations on dwarf bunt of wheat. Phytopathology **31**, 74—82.

15. Kühn, J., 1859: Die Krankheiten der Kulturgewächse, ihre Ursachen und ihre Verhütung. Berlin.

16. Lang, W., 1917: Über die Beeinflussung der Wirtspflanze durch *Tilletia tritici*. Z. Pflanzenkrankh. u. Pflanzenschutz **27**, 80—99.

17. Ling, L., 1940: The histology of infection of susceptible and resistant selfed lines of rye by the rye smut fungus. *Urocystis occulta*. Phytopathology **30**, 926—935.

18. Lowther, C. V., 1948: Low temperature as a factor in the germination of dwarf bunt chlamydospores. Phytopathology **38**, 309—310.

19. — —, 1950: Chlamydospore germination in physiologic races of *Tilletia caries* and *Tilletia foetida*. Phytophatology **40**, 590—603.

20. Niemann, E., 1955: Methodik der künstlichen Infektion mit Zwergsteinbrand und Roggensteinbrand. Z. Pflanzenbau u. Pflanzenschutz **6**, 217—225.

21. — —, 1956: Taxonomie und Keimungsphysiologie der *Tilletia*-Arten von Getreide und Wildgräsern. Phytopath. Z. **28**, 113—166.

22. Pichler, F., 1953: Zur Frage der Keimung von Roggen- und Zwergsteinbrandsporen. Pflanzenschutzber. **9**, 12—17.

23. Popp, W., 1951: Infection in seeds and seedlings of wheat and barley in relation to development of loose smut. Phytophatology **41**, 261—275.

24. Randolph, 1934/35: A new fixing fluid and a revised schedule for the paraffin method in plant cytology. Stain technology **9**, 10.

25. Schaede, R., 1949: Hilfsbuch für die Botanische Mikroskopie. Georg Thieme Verl., Stuttgart.

26. Schmiedeknecht, M., 1956: Untersuchungen des Parasitismus von *Colletotrichum atramentarium* (B. et Br.) Taub. an Kartoffelstauden (*Solanum tuberosum* L.). Phytopath. Z. **26**, 1—30.

27. Schömmer, F., 1949: Kryptogamen-Praktikum. Francksche Verlagshandl., Stuttgart.

28. Sempio, C., 1938: Effeto delle alte temperature sul Frumento cariato al momento della spigatura. Riv. Pat. veg. **28**, 385—387.

29. Wagner, F., 1954: Zur Frage der Resistenz der Weizensorten gegen Zwergbrand. Z. Pflanzenbau u. Pflanzenschutz **5**, 189—190.

30. Warmbrunn, K., 1952: Untersuchungen über den Zwergsteinbrand. Phytopath. Z. **19**, 441—482.

31. Western, J. H., 1936: The biology of oats smuts. The invasion of some susceptible and resistant oat varieties, including Markton, by selected biological species of smut (*Ustilago avenae* [Pers.] Jens., *U. kolleri* Wille). Annals of applied Biology **23**, 245—263.

32. Woolman, H. M., 1930: Infection phenomena and host reactions caused by *Tilletia tritici* in susceptible and nonsusceptible varieties of wheat. Phytopathology **20**, 637—652.

33. Zade, A., 1932: Neue Untersuchungen über den latenten Pilzbefall und seinen Einfluß auf die Kulturpflanzen. Fortschr. Landw. **7**, 529—532.

Aus dem Max-Planck-Institut für Biologie,
Abt. Melchers, Tübingen

Über den Einfluß von Thiouracil und Cytovirin auf das Wachstum und die Virusproduktion isolierter Tomatenwurzeln[1])[2])

Von

L. Bergmann

Mit 3 Abbildungen

Voraussetzung für einen brauchbaren Test auf Chemotherapeutika gegen phytopathogene Viren ist, daß der Grad einer möglichen Schädigung des Wirtes durch das zu untersuchende Agens genau so gut erkennbar und meßbar ist wie die Hemmung der Virusproduktion selbst. Diese Voraussetzung ist bei einer Reihe von Testen nicht erfüllt, mit denen in den letzten Jahren verschiedene Purin- und Pyrimidinderivate auf ihre Eigenschaft als mögliche Chemotherapeutika geprüft worden sind (Literatur-Zusammenstellung siehe Bawden 1954 und Matthews u. Smith 1955). In diesen Testen wurden frisch infizierte, isolierte Blätter oder ausgestanzte Blattscheibchen für die Versuchsdauer auf einer Nährlösung schwimmend gehalten, die die zu untersuchende Substanz enthielt, und anschließend wurde der Virusgehalt der Blätter bzw. Blattscheibchen bestimmt. Die so erhaltenen Ergebnisse zeigen, daß einzelne Purin- und Pyrimidinanaloge, besonders Thiouracil und 8-Azaguanin die Vermehrung von TMV in Tabakblättern stark herabsetzen, und zwar in Konzentrationen, die keine ohne weiteres erkennbare Schädigung des Blattgewebes erkennen lassen, die jedoch das Wachstum ganzer Tabakpflanzen empfindlich hemmen. Dies verwundert nicht, wenn man bedenkt, daß in den für den Test verwendeten Blattgeweben während der Versuchszeit kaum noch Zellteilungen stattfinden, während in den wachsenden Pflanzen ständig eine große Anzahl von Zellteilungen ablaufen, und die damit verknüpften DNS- und RNS-Synthesen durch die Purin- und Pyrimidinanalogen ebenso gestört werden können wie die Virussynthese.

Man wird daher derartige Teste vorteilhaft mit Geweben durchführen, an denen man noch Wachstum, verknüpft mit Zellteilungen, beobachten kann, um so neben der Hemmung der Virussynthese auch Schädigungen der Wirtszelle zu erfassen. Dabei kann man einmal an die Verwendung pflanzlicher

1) Über die Versuche mit Thiouracil wurde bereits von Melchers und Bergmann 1957 berichtet.

2) Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Gewebekulturen denken, wie dies verschiedentlich geschehen ist (KUTSKY u. RAWLINS 1950, SÉGRETAIN 1952, NORRIS 1953, KASSANIS 1957, HILDEBRANDT 1958, MOREL 1948), oder an die Kultur isolierter Wurzeln, die ebenfalls zur Virussynthese fähig sind (WHITE 1934).

Wir haben nach einigen Vorversuchen mit Gewebekulturen von *Nicotiana tabacum* var. „Samsun" und mit isolierten Tomatenwurzeln letzteren den Vorzug gegeben, da diese einmal ein bedeutend rascheres Wachstum zeigen als die Gewebekulturen, und es zum anderen technisch einfacher ist, von den Wurzeln gleichmäßiges Startmaterial für größere Versuchsserien zu erhalten.

Material und Methodik

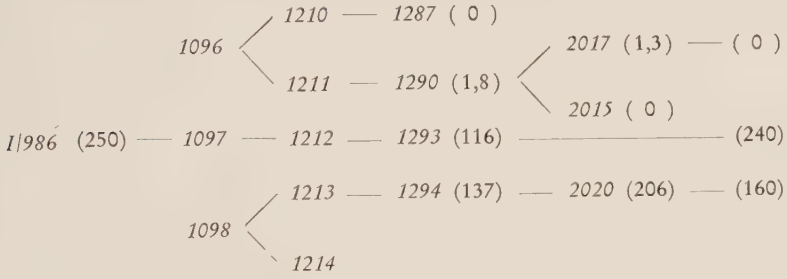
1. Kultur der Wurzeln. — Die Kultur der Wurzeln erfolgte in 300 ml Erlenmeyerkolben, die je 100 ml Nährlösung enthielten, bei 24 °C im Dunkeln. Als Nährlösung diente die von WHITE (1943) angegebene Wurzelnährlösung, in der das $Fe_2(SO_4)_3$ durch äquimolare Mengen Eisencitrat ersetzt wurde. Das pH der Nährlösung wurde mit n/10 HCl zu Versuchsbeginn auf 4,5 eingestellt; es verschob sich während der Versuchszeit auf 5,2 bis 5,6, blieb also innerhalb des Bereiches, in dem noch kein Eisenmangel in der Nährlösung eintritt (STREET 1952).

2. Infektion der Wurzeln in vitro. — Um für unsere Versuche ein möglichst einheitliches Material zu bekommen, wurde aus der Keimwurzel eines Tomatensamens ein Klon herangezogen und später ein Teil dieses Klons mit Tabakmosaikvirus Stamm *vulgare* in vitro infiziert. Die Infektion erfolgte in Petrischalen durch vorsichtiges Reiben der Wurzeln mit Quarzstaub in einer virushaltigen Lösung. Nach der Infektion wurden die Wurzeln in sterile Nährlösung übertragen und nach dem Heranwachsen und der Ausbildung von Seitenwurzeln der Virusgehalt der Wurzeln getestet. Hierzu wurden zunächst die Seitenwurzeln für Subkulturen abgetrennt und in Kolben mit frischer Nährlösung gegeben. Von den verbleibenden Wurzeln wurden gleich große Stücke nach sorgfältigem Abspülen mit destilliertem Wasser in einem Mörser unter Zugabe von m/15 Phosphatpuffer (pH 7,0) homogenisiert und die Extrakte auf *Nicotiana glutinosa* getestet. Etwa die Hälfte erwies sich als virushaltig. Die virushaltigen Wurzeln produzierten zum Teil 200 bis 300 Nekrosen/Blatt, während eine andere Gruppe nur 10 bis 30 hervorbrachte. Von den Wurzeln mit hohem Virusgehalt ausgehend, wurde die Vermehrung fortgesetzt. Es zeigte sich, daß auch die von einer Wurzel mit hohem Virusgehalt stammenden Tochterwurzeln im Laufe einiger Passagen manchmal Virus verloren hatten.

Ein Beispiel hierfür ist in Tabelle 1 wiedergegeben. Von der Wurzel *1/986* mit 250 Nekrosen je Blatt wurden drei Tochterwurzeln isoliert, von denen zwei wieder Subkulturen mit hohem Virusgehalt gaben. Dagegen hatten die Subkulturen der Wurzel *1096* in der dritten Passage teilweise das Virus verloren oder wiesen nur einen stark verminderten Virusgehalt auf, der im Laufe der weiteren Passagen ebenfalls verlorenging. Einen Verlust

Tabelle 1

Fortlaufende Subkulturen
einer mit TMV *vulgare* in vitro isolierten Tomatenwurzel. Vgl. S. 210, 211



des Virus in den Subkulturen der Wurzeln *1097* und *1098* haben wir dagegen während einer Kulturdauer von über zwei Jahren nicht beobachtet. Bei wiederholten Stichproben hatten stets alle getesteten Wurzeln einen hohen Virusgehalt.

Eine unterschiedliche Stärke des Virusgehalts isolierter Wurzeln haben auch Kassanis und Mitarbeiter (1958) bei ihren ebenfalls an Tomatenwurzeln durchgeführten Infektionsversuchen beobachtet und angegeben, daß sie nur von gut durchinfizierten Wurzeln virushaltige Subkulturen erhalten konnten. Sie nehmen an, daß das Virus in den isolierten Wurzeln nicht in dem Maße frei verteilt wird wie in den Wurzeln wachsender Pflanzen, so daß man nur dann andauernd infizierte Wurzeln erhält, wenn die meristematische Zone oder ihr benachbartes Gewebe infiziert sind. Der von uns mehrfach beobachtete Verlust des Virus während der Subkultur junger Seitenwurzeln von anfangs gut infizierten Wurzeln spricht ebenfalls dafür, daß die Ausbreitung einer Virusinfektion in einer isolierten Wurzel manchmal langsamer erfolgt als das Wachstum neu angelegter Seitenwurzeln. Stammen diese aus einer noch nicht infizierten Zelle des Perizykels und werden sie zu früh von der Mutterwurzel getrennt, so besitzen sie kein oder nur wenig Virus, das im Laufe weiterer Subkulturen aus den Wurzeln herausverdünnt werden kann. Wir haben daher für die Vermehrung unserer Wurzeln stets Seitenwurzeln oder Wurzelstücke benutzt, die bereits 4 bis 5 cm lang waren und von denen anzunehmen war, daß sie auch mit Virus durchinfiziert waren.

2. Trockengewichtsbestimmungen der Wurzeln. — Da die Bestimmung des Frischgewichts der Wurzeln ungenau ist, wurde das Trockengewicht der Wurzeln als Bezugsgröße für den Virusgehalt und als Maß für das Wachstum benutzt. Zur Bestimmung des Trockengewichts wurden die Wurzeln mit Aqua bidest. gewaschen und mit Filtrierpapier vorsichtig getrocknet. Dann wurden sie auf frisches Filtrierpapier gelegt und in Exsiccatoren über Chlorkalzium bei Zimmertemperatur bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Anwendung höherer Temperaturen war wegen der anschließend notwendigen Virusextraktion untunlich.

3. Virusbestimmung. — Zur Virusbestimmung verwandten wir die von Bancroft u. Curtis (1957) angegebene Methode, die wir leicht modifizierten. Die Wurzeln wurden mit Aqua bidest. homogenisiert und die Dichte

des Homogenisats so eingestellt, daß 4 bis 6 mg Wurzeltrockenmasse in einem ml enthalten waren. Nach raschem Einfrieren und Wiederauftauen des Homogenisats wurden zu je sieben ml ein ml Chloroform und 0,5 ml N-Amylalkohol gegeben und die Flüssigkeit 10 Minuten auf einer Schüttelmaschine gemischt. Nach 10 Minuten Zentrifugieren bei 2000 g wurde der klare Überstand abgehebert und in je 5 ml des Überstandes das Virus mit 2,5 ml 2 M Trichloressigsäure gefällt. Das gefällte Virus wurde bei 8500 g abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Zentrifugengläser mit dem Sediment sorgfältig in einem Luftstrom getrocknet. Im Gegensatz zu BANCROFT u. CURTIS schleuderten wir das Virus mit 8500 g aus, da wir es mit 2000 g nicht sicher ins Sediment bekamen und leicht etwas Virus verloren. Nach 15 Minuten Hydrolyse des Virus in 5 ml 0,3 M Trichloressigsäure bei 90 °C im Wasserbad und nochmaligem scharfem Zentrifugieren wurde der Überstand sorgfältig abpipettiert und im Beckman-Spektralphotometer die Dichte bei 262 mμ bestimmt.

4. Auswertung der Versuche. — Die Wachstumsmessungen und Virusbestimmungen wurden mit je 20 Wurzeln durchgeführt. Zu Beginn der Versuche wurden mindestens 40 Wurzeln von der Größe des Impfmaterials für die Bestimmung der Startgrößen aufgearbeitet. Das Gewicht und der Virusgehalt der Startwurzeln wurde nach Versuchsende von dem Gesamtgewicht und dem Gesamtvirusgehalt der Wurzeln aus dem Versuch abgezogen, so daß wir als Differenz den Wurzelzuwachs und die Virusproduktion der Wurzeln als Vergleichsgrößen erhielten. Die Versuchsdauer betrug in der Regel zwei Wochen.

Ergebnisse

1. Wachstum und Virusproduktion der Wurzeln

Zwischen den mit Virus infizierten und den nicht infizierten Wurzeln konnten wir keine Wachstumsunterschiede beobachten (Tab. 2). Wir können damit an unserem von einer Wurzel stammenden Klon die Angaben von WHITE (1934) bestätigen, der zwischen einem infizierten und einem zweiten nicht infizierten Tomatenwurzelklon keine Wachstumsunterschiede gefunden hatte. Das gleiche Wachstum von virushaltigen und virusfreien Wurzeln dürfte wohl damit zu erklären sein, daß die Virusproduktion nicht im Meristem erfolgt (WHITE 1943, KERLIN 1957), sondern erst in einem Zellbereich der Wurzeln, der zum Teilungswachstum selbst nichts mehr beiträgt, so daß die Sonderleistung der Virussynthese nicht auf Kosten des Wachstums geht.

Die isolierten Wurzeln enthalten 20 bis 24 mg Virus/g Trockengewicht, was rund 2 % entspricht. Dies ist etwa der dritte Teil der Virusmenge, die wir mit der gleichen Methode in mit TMV *vulgare* systemisch infizierten jungen Blättern von *Nicotiana tabacum* „Samsun" fanden. Diese enthielten 72,0 ± 2,2 mg Virus/g Trockengewicht, oder 10,4 ± 0,5 mg/g Frischgewicht. Da die Wurzeln gegenüber Blättern einen höheren Anteil an Leitgeweben haben, darf man annehmen, daß der Virusgehalt der Wurzeln dem von Blättern in etwa entspricht. Einen Virusgehalt von 2 % des Trockengewichts findet man jedoch nur in gut gewachsenen jungen Wurzeln. Aus älteren

Wurzeln aus 28 bis 42 Tage alten Kulturen erhielten wir nur eine Virusmenge von 14 bis 15 mg/g Trockengewicht. Wahrscheinlich wird in den älteren Wurzelgeweben das Virus wie in älteren Blättern zum Teil wieder abgebaut.

2. Versuche mit Thiouracil und Cytovirin

Für unsere Versuche wählten wir zwei möglichst verschiedene Substanzen, die die Virusvermehrung hemmen. Einmal Thiouracil, von dem bekannt ist, daß es in das TMV eingebaut wird (Jeener u. Rosseels 1953, Jeener 1954, Matthews 1956, Mandel, Markham u. Matthews 1957) und von dem vermutet wird, daß es über den Einbau in die Ribonukleinsäure des Virus dessen Synthese hemmt, und zum anderen Cytovirin, das als Antibiotikum eine Hemmung der Virussynthese auf einem noch völlig unbekannten Wege bewirkt (Gray 1957, Wittmann 1958).

a) Wirkung von Thiouracil auf Wurzelwachstum und Virussynthese

Wie Abbildung 1 zeigt, werden die Virusproduktion und das Wachstum der Wurzeln durch Thiouracil gehemmt. Dabei tritt die Hemmung des Wachstums bereits bei Konzentrationen ein, bei denen noch keine Hemmung der Virusproduktion zu beobachten ist. So ist das Wachstum der Wurzeln bei 3×10^{-6} g/ml Thiouracil bereits um 70 % reduziert, während die Virusproduktion noch unvermindert ist. Sie scheint im Gegenteil sogar in dem Konzentrationsbereich von 1,5 bis $2{,}5 \times 10^{-6}$ g/ml Thiouracil, in dem der Wachstumsrückgang deutlich ausgeprägt ist, noch etwas gesteigert, doch ist die leichte Erhöhung der Virusproduktion nicht signifikant. Die Differenz der Virusproduktionen zwischen 10^{-6} g/ml und 2×10^{-6} g/ml ist in den vorliegenden Versuchen mit einem $P = 0{,}05$ nicht gesichert. Dagegen ist die Wachstumsdifferenz in diesem Bereich mit einem $P = 0{,}002$ gut gesichert.

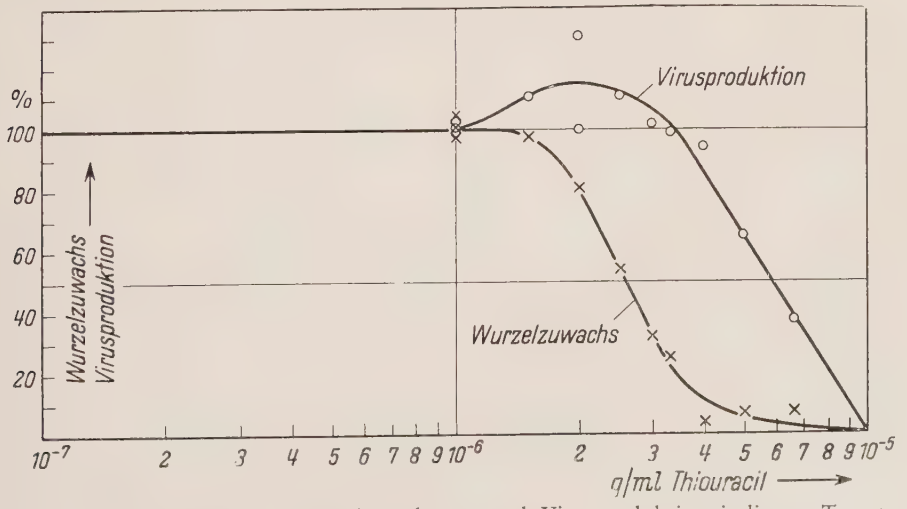


Abb. 1. Einfluß von Thiouracil auf Wachstum und Virusproduktion isolierter Tomatenwurzeln. Werte aus vier Versuchen. Kultur der Wurzeln 14 Tage

Die Wachstumshemmung durch Thiouracil erfaßt in dem gleichen Ausmaß wie die infizierten Wurzeln auch die nicht virushaltigen Kontrollen (Abb. 2). Das Wachstum der Kontrollen ist stets etwas besser als das der infizierten Wurzeln, doch sind die Differenzen, auch wenn man nach PÄTAU (1943) das totale $P = 0{,}04$ für sämtliche Werte als Kriterium heranzieht, nicht gesichert (vgl. auch Tab. 2).

Tabelle 2

Wachstumsvergleich mit TMV *vulgare* infizierter und nicht infizierter isolierter Tomatenwurzeln
Kulturdauer 14 Tage. Mittelwerte aus je 20 Wurzeln ± einfacher mittlerer Fehler

	Wachstum in mg Trockengewicht	
	Virusfreie Wurzeln	Virushaltige Wurzeln
12. 6. 1957	10,6 ± 3,5	10,7 ± 3,6
2. 7. 1957	11,1 ± 2,0	10,3 ± 2,9
24. 7. 1957	8,6 ± 2,4	9,5 ± 2,4
20. 8. 1957	9,4 ± 2,6	9,4 ± 2,4
16. 10. 1957	10,2 ± 2,9	11,5 ± 4,0

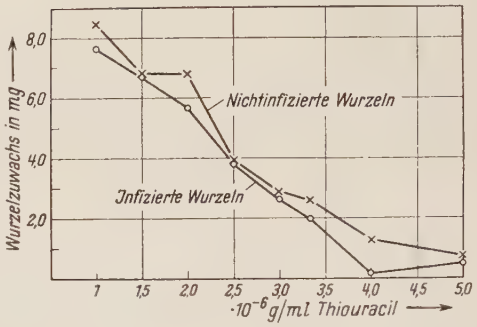


Abb. 2. Wachstumshemmung virusinfizierter und nicht infizierter isolierter Tomatenwurzeln durch Thiouracil. Werte aus vier Versuchen. Kultur der Wurzeln 14 Tage

b) Wirkung von Cytovirin auf Wurzelwachstum und Virusproduktion

Die Versuche mit Cytovirin führten wir mit einem Präparat durch, das uns Herr Dr. R. A. GRAY von der Merck Company zur Verfügung stellte. Wie aus Abbildung 3 hervorgeht, wird auch durch Cytovirin das Wachstum der Wurzeln stärker gehemmt als die Virusproduktion. Eine deutliche Hemmung des Wachstums ist von WITTMANN (1958) auch an mit Cytovirin besprühten Tabakpflanzen beobachtet worden, vor allem, wenn sie, wie für eine Virusinfektion, scarifiziert waren. Die Wirksamkeit des Cytovirins ist in unseren Versuchen wesentlich größer als die des Thiouracils, doch läßt sich ein exakter Vergleich beider Substanzen erst durchführen, wenn das Molekulargewicht des Cytovirins bekannt und es damit möglich ist, die Konzentrationen auf vergleichbarer Basis anzugeben. Da das Molekulargewicht des Antibiotikums kaum kleiner als das des Thiouracils sein dürfte, wird ein quantitativer Vergleich auf der Basis molarer Konzentration keinen kleineren Unterschied geben.

Um zu prüfen, ob die Hemmung des Wachstums und der Virussynthese durch das Cytovirin nur auf einer Verlangsamung notwendiger Syntheseschritte beruht, haben wir Wachstum und Virusproduktion in verschiedenen Zeitabschnitten gemessen. Tabelle 3 gibt die Ergebnisse eines Versuchs wieder, in dem Wachstum und Virusproduktion einmal wie in den übrigen Ver-

suchen nach 14 Tagen bestimmt wurden und dann nach 28 und 42 Tagen. Aus ihr geht hervor, daß das Wachstum der Kontrollwurzeln ohne Cytovirin nach 14tägiger Kultur noch zunimmt, während es in den mit Cytovirin behandelten Wurzeln sistiert ist. Drückt man die Wachstumshemmung der Cytovirin-Wurzeln als Prozent der entsprechenden Kontrollen aus, so scheint diese daher weiter zuzunehmen. Der Virusgehalt der Wurzeln wird in beiden Versuchsgruppen etwas geringer. Diese Abnahme erfolgt jedoch in der Kontrolle und in den Cytovirin-Wurzeln in prozentual gleichem Maße, so daß die Hemmung der Virusproduktion, in Prozent der Kontrolle berechnet, unverändert bleibt. Die Abnahme des Virusgehalts in den Wurzeln beruht wahrscheinlich auf einem Altersabbau, wie wir ihn bereits weiter oben erwähnt haben.

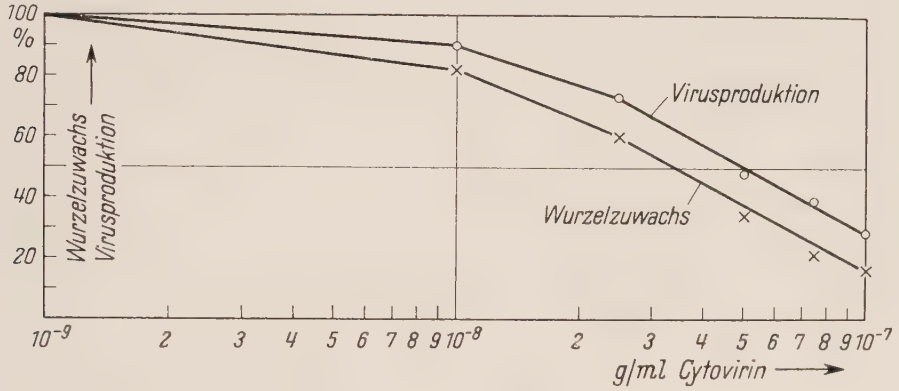


Abb. 3. Einfluß von Cytovirin auf Wachstum und Virusproduktion isolierter Tomatenwurzeln. Werte aus vier Versuchen. Kultur der Wurzeln 14 Tage

Tabelle 3

Wachstum und Virusproduktion isolierter Wurzeln nach verschieden langer Kultur

	Kulturdauer	14 Tage	28 Tage	42 Tage
Kontrolle	Zuwachs	9,0 mg	11,2 mg	14,2 mg
	Virusgehalt	21,0 γ/mg	16,2 γ/mg	14,6 γ/mg
$7{,}5 \cdot 10^{-7}$ Cytovirin	Zuwachs	1,8 mg	1,5 mg	1,5 mg
	Virusgehalt	8,4 γ/mg	6,5 γ/mg	5,5 γ/mg
Wachstumshemmung in %		20	13,4	10,6
Hemmung der Virusproduktion		39,5	40,6	37,6

Eine Herabsetzung der Infektivität des in Gegenwart von Cytovirin gebildeten Virus konnten wir nicht feststellen. Wir prüften dies, indem wir den Virusgehalt eines Homogenisats von Kontrollwurzeln spektrophotometrisch bestimmten und ebenso den Virusgehalt eines gleich dichten Homo-

genisats von Wurzeln, die in einer 5×10^{-8} g/ml Cytovirin enthaltenden Nährlösung gewachsen waren. Die Wachstumshemmung der Wurzeln betrug unter diesen Bedingungen 70 % der Kontrolle. Die Virusmenge in dem Homogenisat der Kontrollwurzeln betrug 105 γ/ml, die in dem Homogenisat aus den Cytovirin-Wurzeln 52 γ/ml. Von beiden Homogenisaten wurden nach Abzentrifugieren der groben Zellbestandteile bei 2000 g gleiche Verdünnungsreihen hergestellt und mit diesen Pflanzen von *Nicotiana tabacum „Xanthi necroticum"* infiziert.

Tabelle 4 gibt die Infektivität der Lösungen in Anzahl Nekrosen je Blatt wieder. Wie aus ihr ersichtlich ist, verhalten sich die Nekrosezahlen der Kontrollen zu denen der aus den Cytovirin-Wurzeln gewonnenen Lösungen innerhalb des untersuchten Bereiches von 10^{-5} bis 10^{-7} g Virus/ml wie 2:1. Die Nekrosezahlen zeigen damit das gleiche Verhältnis wie die spektrophotometrisch bestimmten Viruskonzentrationen der Homogenisate, das heißt, daß das in Gegenwart von Cytovirin gebildete Virus keine geringere Infektiosität besitzt als unter normalen Bedingungen in den Wurzeln produziertes Virus.

Tabelle 4

Infektiosität von Virus aus isolierten Wurzeln, die in einer Nährlösung mit Cytovirin kultiviert wurden. Wachstumshemmung der mit Cytovirin gewachsenen Wurzeln 70 %. Die Viruslösungen wurden auf Xanthiblättern getestet und die Infektiosität in Nekrosen/Blatt angegeben (Mittelwerte aus je 40 Blättern)

	Viruskonzentration des Homogenisats γ/ml	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
Kontrolle ohne Cytovirin	105	368	56	8
$5 \cdot 10^{-8}$ g/ml Cytovirin	52	171	32	6

Diskussion

Alle Versuche, Purin- und Pyrimidinanaloge als Chemotherapeutika gegen Viruskrankheiten einzusetzen, gehen davon aus, durch das Angebot falscher Bausteine die Synthese der NS des Virus zu hemmen. Mehrfach ist diese Hemmung tatsächlich gefunden worden. Da die NS-Synthese für einen wachsenden Organismus aber genau so nötig wie für die Virussynthese ist, muß man erwarten, daß echtes embryonales Wachstum, das Plasmavermehrung zur Voraussetzung hat, durch falsche NS-Bausteine ebenfalls gehemmt wird. Nicht ohne weiteres vorauszusehen war, daß die Hemmung des Wachstums der Tomatenwurzeln schon bei deutlich geringeren Konzentrationen von Thiouracil beginnt, als die Hemmung der TMV-Synthese nachweisbar wird. Da die Virusvermehrung auf die Wurzelmasse bezogen ist, bedeutet das in Abbildung 1 zusammengefaßte Ergebnis, daß das System des Wurzelwachstums — also möglicherweise die Synthese der Tomaten-NS — sogar empfindlicher gegen Thiouracil ist als das der TMV-Synthese. Eine Substanz mit die-

ser Wirkung als Chemotherapeutikum zu bezeichnen, ist nicht möglich (Ehrlich 1909).

Für Cytovirin (Abb. 3) gilt das gleiche, wenn auch nicht so ausgeprägt. Die Ergebnisse im Tomatenwurzeltest sind in allen wesentlichen Punkten durch quantitative Auswertung von Versuchen mit ganzen Tabakpflanzen von Wittmann (1958) bestätigt worden.

Das Ziel dieser Untersuchung war die Ausarbeitung eines einwandfreien Tests auf chemotherapeutische Brauchbarkeit von Substanzen. Im Gegensatz zum sogenannten Blattscheibchentest, bei dem ein Einfluß der zu prüfenden Substanz auf das Wachstum des Wirtsgewebes gar nicht erfaßt werden kann, gestattet der Test mit isolierten Wurzeln eine gute quantitative Beurteilung der Wirkung der zu prüfenden Substanz auf Wirtswachstum und Virussynthese. Auch gegenüber Kallusgewebekulturen als Testmaterial bieten die isolierten Wurzeln erhebliche Vorteile, denn wie eingangs erwähnt, wachsen die Wurzeln so schnell, daß ein Versuch nur etwa zwei Wochen dauert, und außerdem ist der Virusgehalt der Wurzeln etwa zehnmal höher als der von Kallusgewebekulturen. Immerhin ist zu erwähnen, daß durch Hildebrandt et al. 1958 auch mit Sproßkallusgewebe unsere Ergebnisse mit Thiouracil (Melchers und Bergmann 1957) bestätigt wurden.

Es ist bekannt, daß Thiouracil in das Virus eingebaut wird und Virusmaterial, das unter diesen Bedingungen vermehrt wurde, auf Nucleoproteidmenge bezogen eine geringere Infektiosität besitzt als normales. Es ist anzunehmen, daß das auch für das Virus gilt, das in Thiouracil-haltigen Lösungen in unseren Wurzeln synthetisiert wurde, wenn dazu auch keine neuen Versuche gemacht wurden. Für das unter Cytovirinwirkung gebildete Virus gilt das nicht, wie hier nachgewiesen wurde. Das bedeutet also, daß die Hemmung der Virussynthese durch Cytovirin auf einem anderen Wege, möglicherweise unspezifisch über die allgemeine Schädigung des Stoffwechsels der Wirtszellen, erfolgt.

Derzeit besitzen wir keine Substanz, die als Chemotherapeutikum gegen phytopathogene Viren bezeichnet werden könnte, und die Hoffnung, solche Substanzen zu finden, ist sehr gering, weil das Virus keinen eigenen Stoffwechsel besitzt, sondern im Stoffwechsel des Wirts vermehrt wird. Dennoch erscheint die Suche nach Stoffen, die die Synthese des Virus hemmen, nicht völlig hoffnungslos zu sein. Melchers und Bergmann (1957) haben schon darauf hingewiesen, daß in der Tabakvarietät „Ambalema" die Virussynthese deutlich reduziert ist (s. a. Melchers und Schramm 1940). Für diese Eigenschaft des Ambalema-Tabaks sind zwei rezessive Gene verantwortlich (Cameron 1958, dort auch ältere Literatur). Nach unseren heutigen genphysiologischen Vorstellungen bedeutet das, daß in Pflanzen mit diesen zwei rezessiven Genen wahrscheinlich zwei Enzymreaktionen so verändert sind, daß das Gleichgewicht zwischen Synthese eigener Nukleoproteide und Virusnukleoproteid zugunsten des ersten verschoben ist. Da dieser Einfluß durch zwei Gene ausgeübt werden kann, sollte es nicht völlig ausgeschlossen sein, ihn

auch durch eine chemische Beeinflussung des Stoffwechsels von außen zu erreichen. Es erscheint aber nicht eben aussichtsreich, nach den veränderten Enzymwirkungen in Ambalema zu suchen.

Die meisten Chemotherapeutika gegen bakterielle oder Protozoenkrankheiten wurden durch jahrelanges Austesten verschiedener Substanzen in den Laboratorien großer chemischer Werke gefunden. Die entscheidende Voraussetzung für solche Versuche ist ein einfacher quantitativer Test, der Schädigung des Wirts und des Krankheitserregers zu erfassen gestattet. Das von MELCHERS und BERGMANN (1957) vorgeschlagene und hier an zwei Substanzen erprobte Material der isolierten Tomatenwurzeln erfüllt wichtige Forderungen an einen solchen Test: das Wachstum des Wirtsorganismus kann durch einfache Wägungen, d. h. also in einem chemischen Werk durch angelernte Arbeitskräfte bestimmt werden. Die Virussynthese muß allerdings in einem Verfahren bestimmt werden, das erhebliche Sorgfalt und reichlich viele Arbeitsgänge erfordert.

Ursprünglich hatten wir die Hoffnung, den Tomatenwurzeltest ausschließlich auf eine Kulturzeit von zwei Wochen und einfaches Bestimmen der Erntegewichte nach dieser Zeit beschränken zu können. Hätten virushaltige Wurzeln eine geringere Wachstumsrate als virusfreie, so würde man die ersten Anzeichen eines chemotherapeutischen Effekts einer Substanz darin zu erblicken haben, daß mit steigender Konzentration dieser Substanz der Abfall der Zuwachsraten virushaltiger Wurzeln mindestens relativ langsamer als der virusfreier erfolgt. Mit einem idealen Chemotherapeutikum sollte mit steigender Konzentration die bei der Konzentration = 0 vorhandene Differenz der Wachstumsrate in einem Bereich der Konzentration, in dem die virusfreien Wurzeln noch keine Wachstumsdepression zeigen, verschwinden. Das Fehlen einer gesicherten Differenz zwischen Massenzuwachs bei virusfreien und virushaltigen Wurzeln macht diese letzte Vereinfachung des Wurzeltests unmöglich.

Fräulein Ilse LERCHE und Fräulein Inge ZIEGLER danke ich für ihre sorgfältige Mitarbeit bei der Durchführung der Versuche.

Summary

The influence of thiouracil and cytovirin on the growth and the virus production of virus-infected and noninfected tomato roots, grown in vitro, was studied. The roots were all derived from the same clone and a part was infected with tobacco mosaic virus in vitro. The virus-infected roots produced virus to the extent of about 2 % the dry-weight of the roots, but there was no difference of growth between infected and noninfected roots. Cytovirin and thiouracil reduce both growth and virus production. In either case the reduction of growth was greater than the inhibition of virus synthesis.

There was no reduction of the infectivity of virus from roots grown in the presence of cytovirin as has been described for virus derived from thiouracil-treated tissue.

Literaturverzeichnis

Bancroft, J. B., and R. W. Curtis, 1957: A simple method using trichloracetic acid for estimating tobacco mosaic virus concentration. Phytopathology **47**, 79—82.

Bawden, F. C., 1954: Inhibitors and plant viruses. Advances in Virus Res. **II**, 32—57.

Cameron, D. R., 1958: Mosaic tolerance in *Nicotiana tabacum*. Amer. J. Bot. **45**, 564—566.

Ehrlich, P., 1909: Über den jetzigen Stand der Chemotherapie. Ber. dt. chem. Ges. **42**, 1—31.

Gray, A. R., 1957: Inhibition of local-lesion and systemic plant virus infections with a new antiviral agent, cytovirin. Phytopathology **47**, 522 (Abstract).

Hildebrandt, A. C., 1958: Stimulation or inhibition of virus of infected and insect-gall tissues and single cell clones. Proc. N. A. S. **44**, 354—363.

Jeener, R., and J. Rosseels, 1953: Incorporation of 2-thiouracil-^{35}S in the ribose nucleic acid of tobacco mosaic virus. Biochim. Biophys. Acta **11**, 438.

— —, 1954: Influence of thiouracil incorporation in the ribonucleic acid moiety of tobacco mosaic virus on its multiplication. Ibid. **13**, 148—149.

Kassanis, B., 1957: The multiplication of tobacco mosaic virus in cultures of tumorous tobacco tissues. Virology **4**, 5—13.

Kutsky, R. J., and T. E. Rawlins, 1950: Inhibition of virus multiplication by naphthalene acetic acid in tobacco tissue cultures as revealed by spectrophotometric method. J. Bact. **60**, 763—766.

Kerling, L. C. P.: Persönliche Mitteilung.

Mandel, H. G., R. Markham and R. E. F. Matthews, 1957: The distribution of thiouracil in nucleic acid of tobacco mosaic virus. Biochim. Biophys. Acta **24**, 205—206.

Matthews, R. E. F., 1956: Thiouracil in tobacco mosaic virus. Ibid. **19**, 559.

— —, and J. D. Smith, 1955: The Chemotherapy of viruses. Advances in Virus Research **III**, 51—148.

Melchers, G., und L. Bergmann, 1957: Kritische Versuche zur sogenannten Chemotherapie der Viruskrankheiten. Verhandl. d. IV. Internat. Pflanzenschutzkongresses, Hamburg, Bd. 1, im Druck.

— —, und G. Schramm, 1940: Über den Verlauf der Viruskrankheit in anfälligen und resistenten Rassen von *Nicotiana tabacum*. Naturwiss. **28**, 478.

Morel, G., 1948: Récherches sur la culture associée de parasites obligatoires et de tissus végétaux. Ann. Epiphyties N. S. **14**, Série Pathologie Végétale Mémoire **5**, 123—234.

Norris, D., 1953: Reconstitution of virus X-saturated potato varieties with malachite green. Nature **172**, 816.

Pätau, K., 1943: Zur statistischen Beurteilung von Messungsreihen (eine neue t-Tafel). Biol. Zbl. **63**, 152—168.

Ségretain, G., 1952: Action du lait de coco et de l'acide naphtacne acétique sur la multiplication d'un virus en culture de tissus. C. R. Acad. Sci. **235**, 1342—1344.

Ségretain, G., et L. Hirth, 1953: Action de substances azotées sur la multiplication du virus de la mosaique du tabac en culture de tissus. C. R. Soc. Biol. **147**, 1042—1043.

Street, H. E., M. P. McGonagle and S. M. McGregor, 1952: Observations on the staling of White-Medium by excised tomato roots II. Iron availability. Physiol. Plant. **5**, 248—276.

White, P. R., 1934: Multiplication of the viruses of tobacco and aucuba mosaics in growing excised tomato roots. Phytopathology **24**, 1003—1011.

— —, 1954: The cultivation of animal and plant cells. The Ronald Press Comp New York.

Wittmann, H. G., 1958: Untersuchungen über die Wirkung des Cytovirins auf Virusvermehrung und Wirtswachstum. Phytopath. Z. **34**, 221—227.

Aus dem Max-Planck-Institut für Biologie,
Abt. Melchers, Tübingen

Untersuchungen über die Wirkung des Cytovirins auf Virusvermehrung und Wirtswachstum

Von

H. G. Wittmann

Mit einer Abbildung

Die hohen Verluste, die jährlich durch die pflanzlichen Viruskrankheiten verursacht werden, und die Erfolge, die mit chemischen Mitteln in der Bekämpfung anderer Pflanzenkrankheiten erzielt wurden, legen den Gedanken nahe, nach Mitteln zu suchen, die die Virusvermehrung in dem Wirtsgewebe unterdrücken, ohne die Wirtspflanze selbst zu schädigen. Daß große, durch die Natur des Virus bedingte Schwierigkeiten einem solchen Bestreben entgegenstehen, soll hier nur angedeutet werden.

In den letzten Jahren ist eine Reihe von Stoffen und ihre Wirkungen auf pflanzliche Viruskrankheiten beschrieben worden, ohne daß bisher überzeugende Erfolge erzielt wurden (s. Zusammenfassung der Literatur bei Matthews u. Smith 1955). Dies rührt zu einem großen Teil daher, daß solche Mittel, die die Virusvermehrung verhindern, in der wirksamen Konzentration Stoffwechselstörungen oder sogar toxische Effekte verursachen. Die Hemmung der Virussynthese ist demnach nur eine Folge des durch das „Chemotherapeutikum" gestörten Stoffwechsels. Unter diesem Gesichtspunkt hat nur ein solches Mittel Aussicht auf Erfolg, das die Synthese der essentiellen Virusbestandteile spezifisch hemmt, ohne den Ablauf des normalen Stoffwechsels in der Pflanzenzelle zu beeinträchtigen.

Von den in der Literatur bisher beschriebenen und in diesem Zusammenhang interessierenden Verbindungen scheint das in seiner Wirkung auf verschiedene pflanzliche Virosen von Gray (1957) kurz beschriebene Cytovirin, ein Antibiotikum, eines der wirksamsten Mittel zu sein. Außerdem war nach den ersten Versuchen von Bergmann mit Wurzelkulturen die phytotoxische Wirkung viel geringer als etwa die des Thiouracils. Eine quantitative Prüfung der Wirkung des Cytovirins auf die Entwicklung der Symptome des TMV und das Wachstum von Tabakpflanzen schien daher von Interesse zu sein.

Material und Methoden

Die Versuche wurden an jungen Tabakpflanzen *(Nicotiana tabacum* var. „Samsun" bzw. „Java") im Gewächshaus durchgeführt; die Pflanzen hatten zur Zeit der Inokulation 6 bis 8 Blätter und wurden mit hochgereinigtem Tabakmosaikvirus (Stamm *vulgare*) in einer Konzentration von 1×10^{-6} g/ml an einem Blatt inokuliert. Der verwendete TMV-Stamm erzeugt auf beiden Tabaksorten systemische Symptome. Das Cytovirin[1]) wurde 15 Minuten und 3 Tage nach der Inokulation in Konzentrationen zwischen 0,5 und 5×10^{-6} g/ml Wasser aus einer Zerstäuberdüse unter Stickstoffüberdruck auf alle Blätter gespritzt. Es wurde darauf geachtet, daß die Pflanzen bis zu 12 Stunden nach der Spritzung so gegossen wurden, daß das Wasser nicht mit den Blättern in Berührung kam. Die Gewächshaustemperatur betrug tagsüber 20 bis 25 °C, nachts 18 bis 20 °C.

Ergebnisse

Die ersten Versuche dienten dazu, den Einfluß der Cytovirin-Konzentration auf die Toxizität und die Ausbildung von Virussymptomen unter den gegebenen Verhältnissen zu ermitteln. Es zeigte sich, daß bei Cytovirin-Konzentrationen unter $0{,}4 \times 10^{-6}$ g/ml alle Pflanzen trotz der Spritzung systemische Symptome entwickelten, wenn auch später als die nicht behandelten Kontrollen, und daß bei Cytovirin-Konzentrationen über 5×10^{-6} g/ml schwere Toxizitätserscheinungen auftraten, die zum völligen Absterben des inokulierten Blattes und zu lokalen Gewebeschädigungen an den übrigen Blättern führten.

Von den Versuchen, die der quantitativen Ermittlung der Cytovirinwirkung auf das Wachstum der Wirtspflanzen und das Auftreten von Virussymptomen dienten, sei folgendes Experiment angeführt:

90 Pflanzen wurden in folgende sechs Gruppen zu je 15 Pflanzen aufgeteilt:

I. unbehandelt.
II. nicht inokuliert; mit 4×10^{-6} g/ml Cytovirin gespritzt.
III. skarifiziert (ohne Virus); mit 4×10^{-6} g/ml Cytovirin gespritzt.
IV. mit Virus inokuliert; mit 4×10^{-6} g/ml Cytovirin gespritzt.
V. mit Virus inokuliert; mit $0{,}8 \times 10^{-6}$ g/ml Cytovirin gespritzt.
VI. mit Virus inokuliert; mit Wasser gespritzt.

Der Unterschied zwischen den Gruppen I und II soll die Wirkung des Cytovirins auf das Wachstum der Pflanzen erkennen lassen. — Nach den Vorversuchen war zu erwarten, daß Gruppe IV Wachstumsdepression zeigt, obgleich keine Virussymptome auftreten. Um entscheiden zu können, ob es sich bei dieser Wachstumsdepression lediglich um eine Cytovirinwirkung han-

[1]) Das Cytovirin wurde uns von Herrn Dr. R. A. GRAY (Merck, Sharp and Dohme Research Laboratories, Metuchen, N. J. USA) zur Verfügung gestellt.

delt, oder ob ein zusätzlicher, durch die Virusinokulation bedingter Effekt vorhanden ist, wurden die Pflanzen in Gruppe III so behandelt wie in Gruppe IV, nur daß das Einreiben der Blattoberfläche in Gruppe III mit einem mit Wasser statt mit Viruslösung getränkten Mulltupfer erfolgte.

Die Tabelle 1 gibt die Prozentzahl der Pflanzen mit Virussymptomen vier Wochen nach der Inokulation sowie die Gruppenmittel für die Höhe an.

Tabelle 1
Durchschnittliche Höhe der Pflanzen sowie Auftreten von Symptomen in den einzelnen Gruppen

Gruppe	% Pflanzen mit Sympt.	Durchschnittshöhe cm
I	0	31,0
II	0	28,3
III	0	25,4
IV	0	23,7
V	73	26,5
VI	100	22,6

Das Ergebnis der Varianzanalyse zeigt Tabelle 2.

Tabelle 2
Auswertung der Versuchsergebnisse mittels Varianzanalyse

Variabilität	SAQ	FG	Varianzen
insgesamt	2356	89	26,5 = s^2
zwischen	1723	5	345 = s_1^2
innerhalb	633	84	7,54 = s_2^2

SAQ = Summe der Abweichungsquadrate
FG = Freiheitsgrade

Verhältnis der Varianzen: $\frac{s_1^2}{s_2^2} = F = \frac{345}{7{,}54} = 45{,}7$

Für Grenzwahrscheinlichkeit P = 0,005 ist F = 3,65
Für Grenzwahrscheinlichkeit P = 0,01 ist F = 3,23
Für Grenzwahrscheinlichkeit P = 0,05 ist F = 2,32

Da der errechnete F-Wert bedeutend größer als der 0,5 %-F-Wert und damit das Verhältnis der Varianzen sehr gut gesichert ist, ist die Variabilität zwischen den Gruppen wesentlich größer als durch den Zufall bedingt. Aus der Varianzanalyse folgt, daß die Gruppenmittel, als Gesamtheit genommen, untereinander echte Unterschiede aufweisen.

Um zu ermitteln, welche Gruppenmittel sich signifikant unterscheiden, sind in Tabelle 3 die Auswertungen nach dem t-Test angegeben.

Aus Tabelle 3 geht hervor, daß Gruppe I (unbehandelt) im Höhenwachstum von allen anderen Gruppen, die mit Cytovirin gespritzt wurden, sehr deutlich gesichert unterschieden ist; lediglich gegenüber Gruppe II (nicht skarifiziert, nur gespritzt) ist die Sicherung etwas schwächer. Gruppe VI (mit Virus inokuliert und mit Wasser gespritzt) ist im Wachstum allen Gruppen

mit Ausnahme der Gruppe IV (mit Virus inokuliert, mit 4×10^{-6} g/ml Cytovirin gespritzt) unterlegen. Der Befund, daß zwischen IV und VI kein gesicherter Unterschied vorhanden ist, liegt an der starken Wachstumsdepression, die bei VI durch die Virusinfektion und bei IV durch die relativ hohe Cytovirinkonzentration bedingt wird. Obgleich die Pflanzen in Gruppe IV keine Virussymptome zeigen und auch nicht Virus latent enthalten, wie Abimpfungsversuche gezeigt haben, sind sie doch im Wachstum keiner einzigen Gruppe überlegen, sondern nicht nur den Gruppen I und II, sondern auch der Gruppe V (mit Virus inokuliert, mit $0{,}8 \times 10^{-6}$ g/ml Cytovirin gespritzt) gesichert unterlegen, was wieder ein Hinweis dafür ist, daß eine Cytovirinkonzentration, die ausreicht, um die Virusvermehrung zu unterdrükken, Wachstumsdepressionen verursacht, die größer sind als diejenigen, die durch eine schwache Virusinfektion (Gruppe V) bedingt werden.

Tabelle 3

Signifikanz zwischen den Gruppenmitteln

(Bedeutung der römischen Ziffern für die Gruppen siehe Text)

	II	III	IV	V	VI
I	+	+ +	+ +	+ +	+ +
II		+	+ +	—	+ +
III			—	— —	+
IV				+	— —
V					+

Differenzen für

> 99,9	% Sicherheit	= + +
99,0—99,9	% Sicherheit	= +
95 —99	% Sicherheit	= ±
90 —95	% Sicherheit	= —
< 90	% Sicherheit	= — —

Ein weiterer Beweis für die wachstumshemmende Wirkung des Cytovirins zeigt sich im Vergleich der Gruppe V mit Gruppe II bzw. III: obwohl weder III noch II mit Virus inokuliert, sondern nur mit Cytovirin gespritzt wurden und bei II nicht einmal die Kutikula beschädigt ist, sind die Pflanzen in Gruppe V (mit Virussymptomen) in der Höhe nicht gesichert denen in Gruppe II bzw. III unterlegen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß das Cytovirin in einer Konzentration von 4×10^{-6} g/ml bereits deutliche Wachstumsdepressionen bewirkt, und daß nur dann eine völlige Hemmung der Virussynthese zu beobachten ist, wenn die Pflanzen durch die Cytovirinbehandlung im Wachstum deutlich beeinträchtigt sind.

Während in den bisher beschriebenen Versuchen der Einfluß verschiedener Cytovirinkonzentrationen auf die Virusvermehrung und das Wirtswachstum untersucht wurde, war im folgenden Experiment der Zeitpunkt der Cytovirinspritzung, bezogen auf die Inokulation, der variierende Versuchsfaktor.

Von 10 Gruppen mit je 15 jungen, gleichmäßig großen Tabakpflanzen wurden 4 Gruppen zu verschiedenen Zeitpunkten (48 h, 24 h, 6 h, 1 h) vor und weitere 4 Gruppen zu den gleichen Zeiten nach der Inokulation mit Cytovirin in einer Konzentration von 2×10^{-6} g/ml gespritzt. Die Kontrollgruppe wurde eine Stunde nach der Inokulation statt mit Cytovirin nur mit

Wasser und eine weitere Gruppe zum gleichen Zeitpunkt zwar mit Cytovirin gespritzt, doch nicht inokuliert.

Das Auftreten der Sekundärsymptome in den einzelnen Gruppen in Abhängigkeit von der Zeit ist in Abbildung 1 wiedergegeben.

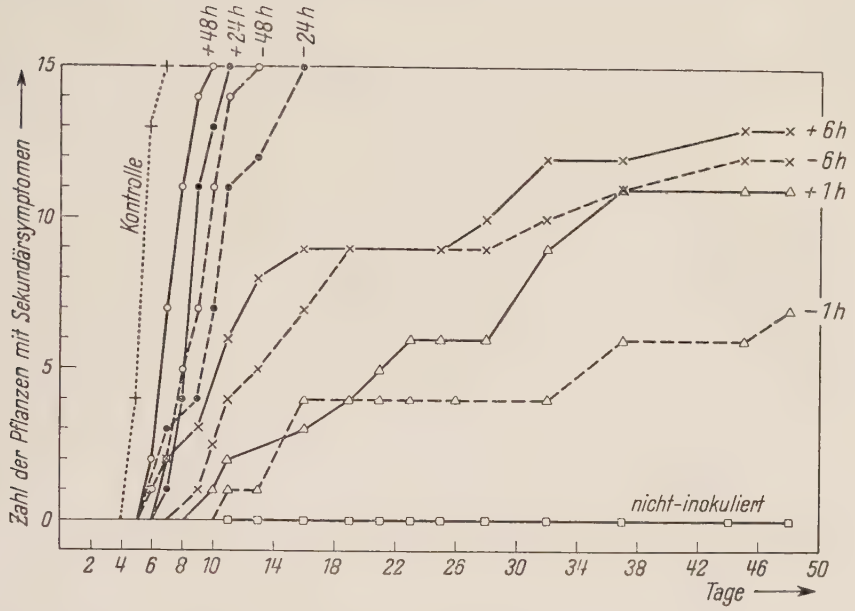


Abb. 1: Auftreten der Sekundärsymptone in Abhängigkeit von dem Zeitpunkt der Cytovirinbehandlung. (Bei —48h erfolgte die Cytovirinspritzung 48 Stunden vor und bei +48h erst 48 Stunden nach der Inokulation).

Aus der Abbildung läßt sich deutlich erkennen, daß die Wirkung des Cytovirins abnimmt, je größer der Zeitraum zwischen Spritzung und Inokulation ist. Bei gleichem Zeitabstand weist die Spritzung vor der Inokulation größere Wirkung auf als die danach. Bei einer Cytovirinspritzung 24 Stunden vor der Inokulation zeigen z. B. alle Pflanzen erst nach 16 Tagen Virussymptome; wird jedoch 24 Stunden nach der Inokulation gespritzt, so dauert es nur 11 Tage, bis alle Pflanzen Virussymptome aufweisen. Ähnliche Unterschiede sind festzustellen, wenn eine Stunde vor bzw. nach der Inokulation gespritzt wird. Von den 15 Pflanzen je Gruppe zeigen am Ende des Versuches, der über 7 Wochen durchgeführt wurde, bei der Spritzung eine Stunde nach der Inokulation 11 Pflanzen, bei einer Stunde vor der Inokulation dagegen nur 7 Pflanzen Sekundärsymptome. Daraus ist zu schließen, daß, je kürzer der zeitliche Abstand zwischen Virusinokulation und Cytovirinwirkung, um so stärker der Einfluß des Cytovirins auf den Stoffwechsel in Richtung Hemmung der Virussynthese ist. Beträgt dieser Zeitraum einen Tag oder mehr, so ist die Cytovirinwirkung deutlich abgeschwächt. Bei Zeiten bis zu 6 Stunden ist die Hemmung der Virusvermehrung so ausgeprägt, daß es bei einem Teil der Pflanzen selbst nach Wochen nach der Inokulation nicht zur Symptomausbildung kommt.

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung des Antibiotikums Cytovirin auf die Vermehrung des Tabakmosaikvirus und auf das Wachstum der Wirtspflanzen untersucht. In den meisten Fällen wird die quantitative Erfassung einer Wirtsschädigung bei der Anwendung eines Chemotherapeutikums unterlassen. MELCHERS u. BERGMANN (1957) haben am Beispiel des Thiouracils in Kulturen isolierter Tomatenwurzeln den Wert einer solchen Untersuchung für die richtige Beurteilung des Chemotherapeutikums gezeigt. Es stellte sich nämlich heraus, daß die prozentuale Reduktion des Wirtswachstums größer ist als die der Virusvermehrung. Das läßt den Schluß zu, daß die Hemmung der Virussynthese nicht auf eine spezifische Wirkung des angewendeten Mittels, sondern eher auf einen gestörten Ablauf des normalen Stoffwechsels in der Pflanze zurückzuführen ist.

Das ideale Therapeutikum soll den normalen Zellstoffwechsel möglichst wenig beeinträchtigen, dagegen die Synthese der für die Infektiosität eines Viruspartikels wesentlichen Bestandteile verhindern. Ob und wieweit dies jedoch möglich ist, erscheint angesichts des Befundes, daß die Aufbaukomponenten pflanzlicher Viren (Aminosäuren, organische N-Basen, Pentosen, Phosphorsäure) normale Metaboliten in jeder Zelle sind, fraglich. Die Verwendung z. B. von Strukturanalogen als Chemotherapeutika, wie im Falle des Thiouracils, wird nicht nur den Einbau der betreffenden Verbindungen (hier des Uracils) in das Virus, sondern auch in die normale Zell-RNS beeinträchtigen. Da die Ribonukleinsäure der Zelle z. B. bei der Proteinsynthese Funktionen hat, die durch keine anderen Zellbestandteile ersetzt werden können, wird sich die Anwendung solcher Mittel als Chemotherapeutika unter anderem in einer Hemmung des Wirtswachstums äußern.

Welche Stoffwechselprozesse das Cytovirin in der Zelle beeinflußt, die schließlich zu einer Hemmung von Virusvermehrung und Wirtswachstum führen, ist bisher nicht bekannt, zumal auch die Strukturformel m. W. noch nicht geklärt ist.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß das Cytovirin mit in die Gruppe derjenigen Stoffe einzureihen ist, bei denen diejenige Konzentration, die eine hemmende Wirkung auf die Virusvermehrung ausübt, nicht sehr verschieden ist von der, bei der eine Störung des Wirtswachstums eintritt. Aus dem durchgeführten Zeitversuch geht außerdem hervor, daß das Cytovirin nur dann voll wirksam ist, wenn es in einem relativ kurzen Zeitraum vor bzw. nach der Inokulation angewendet wird. Wenn die phytotoxische Wirkung des Cytovirins, bezogen auf die Hemmung der Virussynthese, auch nicht so groß wie die des Thiouracils ist, wie BERGMANN (1958) mit dem Tomatenwurzeltest zeigen konnte, so zeigt diese Untersuchung mit ganzen Tabakpflanzen doch — vor allem, wenn man die nicht unbedeutende Toxizität für Mensch und Tier mit berücksichtigt —, daß die Substanz Eigenschaften hat, die wenig mit der Vorstellung von einem idealen Chemotherapeutikum übereinstimmen.

Summary

The effect of the antibiotic cytovirin on the multiplication of tobacco mosaic virus and the growth of the host plants were tested. It was statistically shown that the chemical results in complete inhibition of virus multiplication only at a concentration not very much below toxicity. Spraying at different times before or after the inoculation had a pronounced effect on the period required for the appearance of symptoms.

Literaturverzeichnis

Bergmann, L., 1958: Über den Einfluß von Thiouracil und Cytovirin auf das Wachstum und die Virusproduktion isolierter Tomatenwurzeln. Phytopath. Z. 34, 209—220.

Gray, R. A., 1957: Inhibition of local lesion and systemic plant virus infection with a new antiviral agent, cytovirin. Phytopathology 47, 522, Abstr.

Matthews, R. E. F., and J. D. Smith, 1955: The Chemotherapy of viruses. Adv. in Virus Res. 3, 51—148.

Melchers, G., und L. Bergmann, 1957: Kritische Versuche zur sogenannten Chemotherapie der Viruskrankheiten. Verh. d. IV. Internat. Pflanzenschutzkongr., Hamburg, Bd. 1, im Druck.

Besprechungen

Handbuch der Pflanzenphysiologie. Herausgegeben von W. RUHLAND. Band IX. Der Stoffwechsel der schwefel- und phosphorhaltigen Verbindungen. Redigiert von P. SCHWARZE. X + 306 S. Springer-Verlag, Berlin — Göttingen — Heidelberg 1958. DM 88,— (Subskriptionspreis DM 70,40).

Wie der Bandherausgeber P. SCHWARZE betont, haben die schwefel- und phosphorhaltigen Verbindungen zahlreiche Funktionen bei den spezifischen Stoffwechselprozessen zu erfüllen, so daß sie bei diesen besprochen werden müssen, d. h., ihre Abhandlung verteilt sich auf 9 Bände des Handbuches. Um aber doch einen geschlossenen Überblick über den Schwefel- und den Phosphor-Stoffwechsel zu geben, wird das Wichtigste unter Fortlassung der S-haltigen Aminosäuren und Eiweiße sowie der Nucleinsäuren im vorliegenden Band zusammengefaßt. Diese sich als notwendig ergebende Kompromißlösung hat naturgemäß zur Folge, daß vieles nur sehr kurz abgehandelt wird und die Darstellung viele Verweise auf andere Bände enthält. Manchmal hätte der Herausgeber sogar noch etwas stärker raffen können. So ist es nicht ganz einzusehen, daß bereits auf den ersten 37 Seiten von drei Autoren auf die Bedeutung von S-Verbindungen für die Photosynthese nach CALVIN und die Rolle von Thiamin und Biotin hingewiesen wird. Man muß dem Herausgeber und den Mitarbeitern aber zuerkennen, daß ihnen die Lösung der schwierigen Aufgabe gut gelungen ist und man trotz der angeführten Einschränkungen ein ausgezeichnetes, abgerundetes Bild des ganzen Fragenkomplexes erhält.

Zunächst behandelt BERSIN den Anteil der S-haltigen Verbindungen am Stoffwechsel. Den breitesten Raum nehmen hier die Enzyme ein. Die meisten der behandelten Enzyme sind aus Mikroorganismen, besonders Bakterien, isoliert worden. Den Phytopathologen wird im Hinblick auf schwefelhaltige Spritzmittel usw. interessieren, daß elementarer radioaktiver Schwefel, der auf Blätter und Früchte aufgestäubt wurde, sich nach einiger Zeit im Eiweiß und anderen organischen Verbindungen nachweisen ließ. THOMAS geht bei seiner Darstellung der Assimilation des Schwefels und der Physiologie der S-Verbindungen von dem Bedarf der höheren Pflanze an Schwefel aus. Die Pflanze ist auch befähigt, SO_2-Gas mit den Blättern zur Assimilation aufzunehmen. Dieser Abschnitt enthält unter anderem die Beschreibung der Symptome einer S-Mangelkrankheit, wie überhaupt die Kulturpflanzen im Mittelpunkt der Darstellung stehen. Es wäre empfehlenswert gewesen, die Pflanzenarten nicht immer nur mit den amerikanischen Vulgärnamen zu belegen, sondern wenigstens jeweils einmal auch den lateinischen Namen zu erwähnen. In der Beschreibung der sekundären Schwefelverbindungen und ihrem Vorkommen in systematischer Hinsicht durch KJAER liegt das Schwergewicht auf den Senfölen, über deren Biosynthese wir allerdings noch sehr wenig wissen. SCHWARTZ hebt in seiner Abhandlung über die Schwefelspezialisten unter den Mikroorganismen hervor, daß man statt „Schwefelbakterien" den allgemeinen Begriff „Schwefelmikroben" gebrauchen sollte, da es sich nicht immer um echte Bakterien handelt. Eine Darstellung des Schwefelkreislaufes in der Natur durch WIAME beschließt die sich mit dem Schwefel befassenden Abschnitte.

Der mehr zusammenfassende Charakter tritt in der Darstellung der Physiologie des Phosphors noch stärker hervor. In seiner einleitenden Übersicht weist P. SCHWARZE darauf hin, daß die Klärung der Bedeutung des Phosphors erst in den letzten 25 Jahren erfolgt ist. Die Mehrzahl der P-Verbindungen sind Träger der Dynamik der Stoffwechselvorgänge. Reserven an energiereichem Phosphat in Gestalt des Kreatin- oder Argininphosphates sind bei Pflanzen nicht festgestellt worden; hier übernehmen wahrscheinlich anorganische Polyphosphate diese Rolle. Der Speicherung dieser Polyphosphate und der Phytine widmet WIAME einen Abschnitt. Die folgenden, meist nur sehr kurzen Ausführungen befassen sich mit den Phosphatiden (LOVERN), der Bedeutung der Phosphorsäureester im Kohlenhydratstoffwechsel (UMBREIT: niedere, ALBAUM: höhere Pflanzen). Einen breiteren Raum nehmen die Enzyme ein: Pyridinnucleotide (HASSE), Riboflavinnucleotide (MEEUSE), Thiaminpyrophosphat (O'BRIEN), Coenzym A (ALBAUM), Pyridoxalphosphat (UMBREIT), Transphosphorylierung und daran beteiligte Enzyme (AXELROD). Eine Darstellung der wichtigen Rolle des Phosphors bei der Energieübertragung (BANDURSKI und TE MAY CHING) beendet den Band.

H. DRAWERT, Berlin-Dahlem

Nematoden der Kulturpflanzen Europas

Von Dr. H. Goffart

1951. 144 Seiten mit 91 Abbildungen. In Ganzleinen DM 18,—

Praxis und Wissenschaft erhalten durch dieses auf Grund jahrzehntelanger Beobachtungen geschaffene Werk eine klare Übersicht über die wichtigsten Arten der Nematoden und die durch sie hervorgerufenen Schäden an den verschiedenen Kulturpflanzen. Ein ausführliches Schrifttumsverzeichnis sowie alphabetische Zusammenstellungen der berücksichtigten Pflanzen und der aufgeführten Nematoden erhöhen die Übersichtlichkeit dieses hervorragend ausgestatteten und mit zahlreichen Zeichnungen und Abbildungen versehenen Werkes.

„Goffart hat es verstanden, ein Nachschlage- und Bestimmungsbuch zu schaffen, welches alles Überflüssige vermeidet und dafür das Wesentliche klar und eindringlich für Fachkreise zusammenfaßt." Berichte über die gesamte Biologie

Die Symptomatologie der Fusarium-Welken der Gurke

(*Cucumis sativus* L.)

und ihr Verhältnis zu den Welkekrankheiten anderer Pflanzen

Von Dr. W. Kosswig

1955. 147 Seiten mit 45 Abbildungen und 8 Tabellen

Ganz auf Kunstdruckpapier. Kartoniert DM 14,—

Am Beispiel zweier Fusariosen der Gurke (*F. oxisporum, F. solani*) wird die Bedeutung der Symptomatologie, deren Schlüsselstellung in der Human- und Veterinärmedizin längst anerkannt ist, auch für die Phytomedizin herausgestellt. Es wird gezeigt, welche Möglichkeiten für die diagnostische und ätiologische Auswertung des Krankheitsbildes bestehen, wobei neben den äußeren Krankheitsmerkmalen auch die pathologische Anatomie entsprechende Berücksichtigung findet. Ein Vergleich dieser Fusariosen mit den Welkekrankheiten, speziell den Tracheomykosen, bei anderen Wirtspflanzen aus insgesamt 24 Familien führt zu dem Ergebnis, daß das Krankheitsbild weitgehend vom Wirt her bestimmt wird. Werden die beiden Hauptsymptome — Welken und Vergilben —, die gleichzeitig den akuten und den chronischen Verlauf der Krankheiten charakterisieren, als Grundlage für die Einteilung der behandelten Familien in einer Welkegruppe und in eine Vergilbungsgruppe verwandt, so stehen diese Familien und ihre Ordnungen in einem phylogenetischen Zusammenhang. Pathologen und Physiologen werden den Ursachen hierfür nachzugehen haben. Der Systematiker wird sich mit den Ausnahmen innerhalb dieses phylogenetischen Zusammenhanges (z. B. Cucurbitales) und den Vorschlägen zur (phylogenetischen) Eingliederung bisher umstrittener Familien und Ordnungen auseinanderzusetzen haben. Die klinische Untersuchung der Tracheomykosen und der Martiella-Fusariosen, die eine weitgehend unspezifische Reaktionsweise der Wirtspflanzen erkennen läßt, führt zu Fragen über die Ätiologie der Welkekrankheiten und den Mechanismus des pathologischen Welkens, was im besonderen Probleme der pathologischen Physiologie berührt. Bemerkungen zur Terminologie der Welkekrankheiten, die die symptomatologisch oder ätiologisch bestimmte Namensgebung diskutieren, beschließen die Arbeit.

VERLAG PAUL PAREY / BERLIN UND HAMBURG

Anzeiger für Schädlingskunde

vereinigt mit „Schädlingsbekämpfung"

Zugleich Nachrichtenblatt der Deutschen Gesellschaft für angewandte Entomologie e. V.

Herausgebergemeinschaft: Dr. W. Frey, Berlin / Prof. Dr. H. Kemper, Berlin / Ob.-Reg.-Rat Dr. E. Leib, Bonn / Prof. Dr. Dipl.-Ing. E. Schimitschek, Hann.-Münden / Prof. Dr. W. Zwölfer, München. Schriftleitung: Prof. Dr. Dipl.-Ing. E. Schimitschek

Der „Anzeiger für Schädlingskunde" wurde im Jahre 1925 von dem Nestor der angewandt-entomologischen Wissenschaft in Deutschland, Prof. Dr. Dr. h. c. K. Escherich, sowie Prof. Dr. F. Stellwaag begründet. Seit dieser Zeit sind die Probleme einer wirksamen Bekämpfung der Schädlinge immer aktueller geworden und die Kenntnisse über die Arten und die Lebensweise der Schädlinge sowie die Methoden ihrer Bekämpfung zu einer umfangreichen und bedeutenden Wissenschaft angewachsen. Die Zeitschrift vermittelt diese Erkenntnisse und ihre Nutzanwendung und fördert somit die Zusammenarbeit von Forschung, Lehre und Praxis. Der „Anzeiger für Schädlingskunde" dient damit den gleichen Zielen wie Forschung und Praxis: Erzielung höherer Erträge auf allen ernährungswichtigen Gebieten, Gewährleistung sicherer Ernten, Schutz der Vorräte vor Verderb und Vernichtung, Erhaltung der Volksgesundheit durch Bekämpfung von Nahrungsmittelschädlingen und Ungeziefer.

Seit 1954 erscheint der „Anzeiger für Schädlingskunde" vereinigt mit der Zeitschrift „Schädlingsbekämpfung" und ermöglicht damit eine Orientierung über das Gesamtgebiet der Bekämpfung tierischer Schädlinge in einer geschlossenen Übersicht. Neben den Originalarbeiten ergänzen kleine Mitteilungen, Tagungsberichte, Buchbesprechungen, Personalien, Zeitschriftenreferate, Kurzberichte und eine umfassende Patentschau den reichhaltigen Inhalt. Auf instruktive und sorgfältige Illustrierung aller Beiträge wird besonderer Wert gelegt.

Erscheinungsweise

Der „Anzeiger für Schädlingskunde vereinigt mit Schädlingsbekämpfung" erscheint monatlich. Jedes Heft hat einen Umfang von 16 Seiten im Format DIN A 4. Der Bezugspreis beträgt vierteljährlich DM 12,—, zuzügl. Versandkosten. Einzelheft DM 5,—

VERLAG PAUL PAREY / BERLIN UND HAMBURG

Verlag: Paul Parey, Berlin SW 61, Lindenstraße 44-47, Tel. 61 44 68/69. — Herausgeber: Prof. Dr. E. Gäumann, Zürich 6, Universitätsstr. 2, Prof. Dr. M. Klinkowski, Aschersleben, Ermslebener Str. 52, und Prof. Dr. H. Richter, Berlin-Dahlem, Königin-Luise-Straße 19. Printed in Germany (West-Berlin). Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des auszugsweisen Nachdrucks und der photomechanischen Wiedergabe vorbehalten. — Erscheinungsweise: Jährlich etwa 10—12 Hefte (4 Hefte = 1 Band).